

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 967**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2008** **E 08754530 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013** **EP 2160200**

54 Título: **Productos de fusión anticuerpo-LIGHT como productos terapéuticos de cáncer**

30 Prioridad:

14.05.2007 US 917852 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.12.2013

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF CHICAGO (100.0%)
5801 SOUTH ELLIS AVENUE
CHICAGO, IL 60637, US**

72 Inventor/es:

FU, YANG-XIN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 433 967 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Productos de fusión anticuerpo-LIGHT como productos terapéuticos de cáncer

Antecedentes

Se divulgan composiciones para su uso en un procedimiento de marcado como objetivo de células tumorales con la proteína LIGHT unida a un antígeno tumoral. El marcado como objetivo reduce el crecimiento tumoral y reduce metástasis.

La escasez de células T activadas infiltrándose en tumores establecidos en huéspedes inmunocompetentes ayuda a explicar la incapacidad de los huéspedes para eliminar los tumores. Los experimentos en modelos animales así como los estudios clínicos indican que el sistema inmune puede reconocer y matar células tumorales individuales, pero un huésped no puede erradicar generalmente tumores sólidos establecidos. Hay varias explicaciones para el fallo del huésped en responder de forma efectiva a los tumores establecidos: 1) carencia de inducción de células T tempranas debida a presentación directa o indirecta pobre en los tejidos linfoides debida a un número inadecuado de células tumorales (especialmente aquellas de origen no hematopoyético) que migran al tejido linfoide; 2) número inadecuado de células inmunes que migran a los sitios tumorales debido a barreras biológicas alrededor de tejidos tumorales; 3) células T específicas de antígeno activadas agotadas o de vida corta que no consiguen combatir el crecimiento tumoral debido a repertorios limitados; 4) no responsividad o ignorancia de células T a tumores; 5) un microambiente inhibitorio o una carencia de estimulación dentro de tumores para activar el sistema inmune.

Clínicamente, un incremento en la infiltración de células T al sitio tumoral está asociada estrechamente con mejor pronóstico. Los estudios anteriores han mostrado que vacunaciones preventivas fueron efectivas en inducir el rechazo de células tumorales inoculadas. Después de que el crecimiento tumoral se ha establecido, sin embargo, las vacunaciones terapéuticas usualmente no consiguen rechazar tumores. La reducción quirúrgica de tumores no refuerza la respuesta inmune a tumores. Además, se ha comunicado que incluso la expresión de un antígeno fuerte en células tumorales fue insuficiente en promover el rechazo de un tumor establecido, a pesar de la presencia de números excesivos de células T específicas de antígenos en los tejidos linfoides. La carencia de inducción de células T y/o de células T infiltrándose en un tumor establecido es uno de los mayores obstáculos bien para técnicas naturales o bien para enfoques terapéuticos contra cánceres antigénicos. Además, la expresión insuficiente de moléculas coestimuladoras dentro de tejidos tumorales pueden fallar en activar células T que se infiltren y dar como resultado la anergia de las células T reactivas frente a tumores.

La carencia de inducción de células T tempranas se atribuye posiblemente a solamente unas pocas células tumorales que migran desde el tejido sólido hasta los tejidos linfoides para presentación directa. El análisis genético usando quimeras de médula ósea ha revelado dos modos de presentación antigénica para células T CD8+ restringidas a MHC-I. La inducción directa está mediada por el compromiso de las células T con las células que sintetizan la proteína con epítopos antigénicos, mientras que la inducción cruzada está mediada por las células que presentan antígeno de huésped que toman antígenos sintetizados por otras células. Los mecanismos para inducir células T específicas de tumores se han debatido fuertemente y hasta la fecha permanecen inconcluyentes. Comprender como y donde se presentan los tumores antigénicos a células T ayudaría a encontrar una acción terapéutica contra tumores.

LIGHT (homólogo a linfotóxina, muestra expresión inducible y compite con glicoproteína D HSV por mediador de entrada de herpesvirus, un receptor expresado por linfocitos T) es una glucoproteína transmembrana de tipo II recién identificada de la superfamilia de ligandos TNF. LIGHT (TNFSF14) es un miembro de la familia de los factores de necrosis tumoral (TNF) que interacciona con receptor de Linfotóxina β (LT β R) y mediador de la entrada de herpesvirus (HVEM) expresado principalmente en células estromales y células T, respectivamente. Se requiere la señalización LT β R para la formación de estructuras linfoides organizadas, que se pueden atribuir, al menos en parte, a su capacidad para inducir la expresión de quimiocinas y de moléculas de adhesión que atraen células T no inmunizadas y células dendríticas (DC) en órganos linfoides. La estimulación de LT β R en células estromales por LIGHT *in vivo* conduce a la expresión de CCL21, que atrae células T no inmunizadas en el área de células T del hígado en ausencia de LT $\alpha\beta$, otro ligando para LT β R. Estos resultados demuestran que LIGHT es capaz de interactuar con LT β R para regular la expresión de quimiocina CCL21. Además, LIGHT presenta una actividad co-estimuladora independiente de CD28, potente para inducción de células T y para liderar la expansión de células T a inmunidad de células T contra tumores mejorada y/o a autoinmunidad incrementada. Se requiere señalización por medio de LT β R para la formación de tejidos linfoides organizados. La linfotóxina en receptor β (LT β R) juega un papel importante en la formación de estructuras linfoides. LT β R se activa por dos miembros de la familia TNF, linfotóxina de membrana $\alpha\beta$ y LIGHT. LT β R juega papeles cruciales en la formación de nódulos linfáticos (LN) y en la organización distinta de zonas T, B en órganos linfoides secundarios. La vía de señalización LT β R regula la expresión de quimiocinas y moléculas de adhesión dentro de órganos linfoides secundarios. Las quimiocinas y las moléculas de adhesión controlan la migración y el posicionamiento de CD y linfocitos en el bazo. La sobre-expresión de LT o TNF solubles en tejidos no linfoides fue suficiente para promover neogénesis linfoides funcional.

LIGHT se ha llamado también HVEM-L y LT- γ . Según la nueva nomenclatura de TNF, ello se llama TNFSF14. LIGHT es una proteína de 240 aminoácidos (aa) que contiene un dominio citoplásmico de 37 aa, un dominio transmembrana de 22 aa y un dominio extracelular de 181 aa. De forma similar a otros miembros de la familia de ligandos de TNF, se

predice que LIGHT se ensambla como un homotrímero. LIGHT se produce por células T activadas y se identificó primero por su capacidad para competir con glucoproteína D de HSV para unión de HVEM. LIGHT ha estado mostrando también unir el receptor de linfotóxina beta (LTβR) y el receptor señuelo (DcR3/TR6).

LIGHT juega un papel único en la activación de células T y en la formación del tejido linfóide. Las interacciones entre LIGHT y LTβR restauran las estructuras linfoides en el hígado de ratones LTα^{-/-}. Además, la regulación al alza de LIGHT causa activación de células T y migración en tejidos no linfoides manteniendo la formación de estructuras similares a linfoides. Por el contrario, los ratones LIGHT^{-/-} mostraron activación de células T alterada y rechazo cardíaco retrasado. Por lo tanto, LIGHT es una molécula coestimuladora potente que también promueve la formación de tejidos linfoides para potenciar las respuestas inmunes locales. La carencia de inducción eficiente de células T en drenar tejidos linfoides y la incapacidad para expandir las células T específicas de tumores en el interior de los tumores evita la erradicación del cáncer.

Pueden llegar a establecerse micrometástasis (pequeños agregados de células cancerosas visibles microscópicamente) en una fase muy temprana en el desarrollo de tumores primarios heterogéneos y sembrar sitios de tejidos distales antes de su detección clínica. Por ejemplo, la metástasis detectable en cáncer de mama se puede observar cuando el tamaño del tumor primario es muy pequeño. Por lo tanto, en el momento del diagnóstico, muchos pacientes de cáncer tienen ya metástasis microscópicas, una observación que ha conducido al desarrollo de terapia coadyuvante postquirúrgica para pacientes con tumores sólidos. A pesar de estos avances, el éxito ha sido limitado y el tratamiento óptimo de enfermedades metastásicas continúa planteando un reto significativo en terapia del cáncer.

Una diversidad de cánceres humanos y murinos han estado demostrando ser antigénicos y capaces de reconocerse por células T. Las células T reactivas frente a tumores podrían teóricamente buscar y destruir células cancerosas positivas en antígenos tumorales y evitar los tejidos sanos circundantes. Sin embargo, las respuestas de células T que existen en la naturaleza contra malignidades en seres humanos a menudo no son suficientes para causar regresión de los tumores, primarios o metastásicos. Se ha comunicado recientemente que tumores espontáneos esporádicos, pero inmunógenos evitan la destrucción induciendo tolerancia de células T. Sin embargo, la activación de células T específicas de antígenos tumorales puede evitar completamente el desarrollo de tumores espontáneos. Así, romper la tolerancia y generar tales células T capaces de rechazar tumores alrededor del momento de tratamiento del tumor primario podría representar una aproximación potencial para eliminar células tumorales metastásicas. Como variantes de pérdida de antígeno pueden escapar de la presión inmunológica, la inmunoterapia debería ser aplicable de forma independiente del conocimiento de antígenos tumorales específicos.

Desde una perspectiva inmunológica, las estrategias clínicas actuales dificultan la defensa inmune contra malignidades y disminuyen adicionalmente la efectividad de inmunoterapia. Aunque la eliminación de un tumor puede revertir la supresión inmune inducida por tumores, la escisión quirúrgica del tumor primario también elimina la fuente principal de antígeno, lo que puede conducir a una reducción de la activación de linfocitos T citotóxicos (CTL) dado que la eficacia de inducción está correlacionada con la carga de antígeno tumoral. Además, los tratamientos coadyuvantes actuales, que incluyen quimioterapia y terapia de radiación, que pretenden matar las células tumorales residuales pueden de hecho alterar las respuestas inmunes destruyendo o inhibiendo las células T.

La enfermedad metastásica es la causa principal de morbilidad y mortalidad en cáncer. Mientras que la cirugía, la quimioterapia y la radiación pueden controlar a menudo el crecimiento del tumor principal la erradicación exitosa de las metástasis diseminadas sigue siendo rara. Un problema no resuelto es si tal respuesta permite a los CTL entrantes educarse y después salir del sitio del tumor. Otro problema no resuelto es si estos CTL pueden después vigilar y eliminar de forma efectiva células tumorales metastasizadas espontáneamente en la periferia. El tratamiento local de tumor con LIGHT genera abundancia de CTL específicos de tumores que salen del tumor primario y se infiltran en tumores distales para erradicar completamente las metástasis espontáneas preexistentes.

Como se indica anteriormente, las respuestas de células T contra malignidades que se dan de forma natural en seres humanos a menudo no son suficientes para causar regresión en tumores, primarios o metastásicos. La inmunoterapia facilitaría potencialmente que las células T reactivas frente a tumores puedan ver y destruir células cancerosas positivas a antígeno tumoral diseminadas mientras que evitan los tejidos sanos circundantes, pero la vacunación activa para el huésped portador de tumores muestra solamente beneficio limitado. La carencia de antígenos bien definidos en la mayoría de los tumores limita bien la terapia de vacunación activa o bien la terapia de transferencia adoptiva. La inmunoterapia que es efectiva incluso sin determinación de antígenos específicos de tumores sería más aplicable y más factible terapéuticamente. Sin embargo, aún no está claro cuando y como reforzar respuestas inmunes activas contra tejidos tumorales.

Las células T no inmunizadas o las células T efectoras-de memoria pueden dejar la periferia y entrar en los nódulos linfáticos que se drenan por un procedimiento activo. No se conoce aún si se recluta número suficiente de CTL específicos de tumores para poder sobrevivir al tumor primario y salir del microambiente para vigilar los tejidos periféricos y erradicar metástasis diseminadas. Además, un reto en desarrollar una inmunoterapia efectiva es idear un enfoque para incrementar el número de o para mejorar la función de células T específicas de tumores circulantes que pueden detectar y destruir células metastásicas microscópicas antes de que lleguen a ser clínicamente significativas. Según se divulga en el documento US 2005/0025754, la administración de LIGHT, usando un adenovirus recombinante, dentro del tumor primario puede ayudar a generar CTL que puede después salir del tumor local y vigilar

el tejido periférico para erradicar metástasis antes de que lleguen a ser clínicamente significativas. El documento WO 2003/040307 A2 describe, entre otros, complejos heterotriméricos de polipéptidos de LIGHT y polipéptidos de Linfotóxina-beta, polipéptidos de FasL y polipéptidos de VEGI-SV. El documento US 2005/025754 A1 se ocupa de LIGHT mutante expresada en un ambiente tumoral.

- 5 En la presente divulgación los productos de fusión de anticuerpo-LIGHT/conjugados de anticuerpo-LIGHT o productos ligados generan inmunidad fuerte contra tumor primario y metástasis.

Sumario

La invención se puede definir por las reivindicaciones adjuntas.

- 10 Las células tumorales marcadas como objetivo con proteína LIGHT o con un fragmento peptídico de la misma unidas a un anticuerpo contra un antígeno tumoral reducen el crecimiento de tumores y reducen también metástasis incluyendo micrometástasis. Adicionalmente, las citocinas unidas a un anticuerpo contra antígenos tumorales son útiles contra micrometástasis.

- 15 Inducir una respuesta inmune en tejidos tumorales por medio de una composición de fusión de anticuerpo-LIGHT o de conjugado de anticuerpo-LIGHT antes de cirugía genera células T efectoras específicas de antígenos inducidas suficientes que salen del tumor y erradican metástasis. Un anticuerpo específico para un antígeno de cáncer y LIGHT que es resistente a digestión por proteasas (por ejemplo, LIGHT mutante) puede administrarse también por separado. Marcar como objetivo el tumor primario con TNFSF14 (LIGHT) previamente a escisión quirúrgica es una nueva estrategia para facilitar respuesta inmune mejor para la erradicación de metástasis espontáneas. El tratamiento de anticuerpo-LIGHT ralentiza el crecimiento de tumor agresivo.

- 20 La presente invención se refiere a una composición según se define en la reivindicación 1 o a una proteína quimérica según se define en la reivindicación 12.

Una composición incluye un anticuerpo específico de tumores unido a un fragmento de una proteína LIGHT humana, en la que el fragmento LIGHT es resistente a digestión por proteasas en un ambiente tumoral y es suficiente para estimular linfocitos T citotóxicos contra células tumorales.

- 25 Una composición incluye un anticuerpo específico de tumores unido a un fragmento de una proteína LIGHT. El anticuerpo y el fragmento de la proteína LIGHT puede formar una proteína de fusión, o el fragmento de la proteína LIGHT puede conjugarse químicamente o unirse de otro modo al anticuerpo o a un fragmento del anticuerpo.

- 30 Cualquier fragmento peptídico derivado de proteína LIGHT incluyendo péptidos recombinantes, péptidos sintéticos, proteína LIGHT recombinante, proteína LIGHT mutante, proteína LIGHT truncada, dominio extracelular de LIGHT, dominios conservados de LIGHT, peptidomiméticos que se parecen a un dominio LIGHT, proteína LIGHT o péptidos de la misma con aminoácidos modificados es adecuado para usar en inducir respuesta inmune ligándose o conjugándose o fusionándose a un agente específico de tumores, tal como, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo, siempre y cuando el fragmento de LIGHT sea capaz de estar presente de manera estable en una superficie de célula tumoral.

- 35 Una composición incluye un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo quimérico o un heteromínic anticuerpo o una cadena de anticuerpos individual.

Un fragmento de anticuerpo usado en conjunto con LIGHT es suficiente para reconocer un antígeno tumoral. El fragmento es suficiente para estimular linfocitos T citotóxicos.

- 40 Un fragmento de LIGHT puede incluir aproximadamente 100-150 aminoácidos de LIGHT. Un fragmento de LIGHT puede incluir una secuencia de aminoácidos desde posiciones de aproximadamente 85-240 de LIGHT. Un fragmento de LIGHT puede incluir también aproximadamente 100-150 aminoácidos de LIGHT. Un fragmento de LIGHT puede incluir una secuencia de aminoácidos desde posiciones de aproximadamente 90-240 de LIGHT. Un fragmento de LIGHT puede incluir una secuencia de aminoácidos desde posiciones de aproximadamente 84-240 o 83-240 o 82-240 de LIGHT.

- 45 Un fragmento de LIGHT puede incluir también aproximadamente 100-150 aminoácidos de LIGHT, siempre y cuando el fragmento sea capaz de inducir respuesta inmune contra células tumorales. Un fragmento de LIGHT puede incluir una secuencia de aminoácidos desde posiciones de aproximadamente 90-235 de LIGHT.

Un fragmento de LIGHT es un fragmento resistente a proteasas. Un fragmento de LIGHT puede incluir una mutación en una secuencia de reconocimiento de proteasas EQLI.

- 50 Se divulga una composición en la que el fragmento de LIGHT incluye un dominio extracelular con una secuencia aminoácida:

QLHWRLGEMVTRLPGPAGSWEQLIQERRSHEVNPA AHLTGANSSLTGSGGP
LLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYIIYSKVQLGGVGCPLGLASTIT
HGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEKV
VVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV.

La composición de la presente invención es para usar en un procedimiento de reducción del crecimiento de tumor primario y/o de metástasis cancerosas, que incluye las etapas de:

- 5 administrar una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo específico de tumor unido a un fragmento polipeptídico de LIGHT; y

reducir el crecimiento de tumor primario y/o de metástasis cancerosas estimulando activación de células T específicas de tumores contra el tumor.

El anticuerpo reconoce un antígeno tumoral de superficie y el anticuerpo puede conjugarse al fragmento de LIGHT fusionado químicamente o recombinantemente o unido de otra manera al fragmento LIGHT.

- 10 La composición farmacéutica que incluye el anticuerpo-LIGHT puede administrarse intravenosamente.

Las metástasis cancerosas pueden reducirse por estimulación de al menos una de las siguientes que incluyen quimiocinas, moléculas de adhesión y moléculas coestimuladoras para inducir células T no inmunizadas. Los tipos de cáncer incluyen cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de colon y cáncer de piel.

- 15 La composición de la presente invención es para usar en un procedimiento de reducción del crecimiento de tumor primario y/o de metástasis cancerosas, que incluye las etapas de:

(a) administrar una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo específico de tumor unido a un fragmento polipeptídico de LIGHT;

(b) introducir una molécula de ácido nucleico que codifica LIGHT o un fragmento de la misma dentro de un individuo en un sitio tumoral, en el que la proteína LIGHT es resistente a proteasas; y

- 20 (c) reducir el crecimiento de metástasis cancerosas de tumor primario estimulando activación de células T específicas de tumores contra el tumor.

El ácido nucleico se puede administrar a un tumor pre-existente o el ácido nucleico se administra a un sitio distal respecto a un sitio de tumor pre-existente.

Un agente quimioterapéutico puede administrarse también durante o antes de una terapia de anticuerpo-LIGHT.

- 25 La radioterapia puede administrarse también durante o antes de o después de una terapia de anticuerpo-LIGHT.

Las realizaciones de un anticuerpo que es específico para un antígeno tumoral pueden seleccionarse del grupo que consiste en HER2, HER4, HER8, STEAP y EGFR y cualquier otro antígeno anticancerígeno.

Se divulga una proteína quimérica que incluye una región peptídica que reconoce un antígeno tumoral y un fragmento de una proteína LIGHT. El agente puede ser un ligando que une un receptor de superficie tumoral.

- 30 Se describe una composición que incluye un fragmento de una proteína LIGHT y un agente que reconoce específicamente una célula tumoral.

Una composición farmacéutica que incluye un fragmento peptídico de LIGHT acoplado a un componente específico tumoral. El componente específico tumoral puede incluir un ligando a un receptor en una superficie celular tumoral o a un receptor que reconoce un ligando sobre la superficie celular tumoral.

- 35 La composición de la proteína quimérica de la presente invención es para usar en un procedimiento para tratar tumores (tumores sólidos en particular) en el que microambientes similares a linfoides que expresan quimiocinas, moléculas de adhesión y moléculas coestimuladoras requeridas para inducir células T no inmunizadas y para expandir células T activadas se crean por el uso de moléculas LIGHT mutantes. Se generan células T más generales contra tumores. La administración directa de fusión de anticuerpo-LIGHT o de conjugados anticuerpo-LIGHT es efectiva contra tumores y metástasis. El volumen tumoral está reducido *in vivo* cuando los conjugados de anticuerpo-LIGHT o los productos de fusión de anticuerpo-LIGHT están dirigidos a tumores según se comparan con tumores tratados con controles.
- 40

En diversas realizaciones, la LIGHT mutante tiene un cambio aminoacídico en un sitio proteolítico que incluye una secuencia aminoacídica EQLI a partir de las posiciones 81-84 de la proteína LIGHT nativa. En una realización, la

LIGHT mutante no tiene el sitio proteolítico, una secuencia aminoacídica EQLI a partir de las posiciones 81-84 de la proteína LIGHT nativa.

La molécula de ácido nucleico divulgada codifica una LIGHT recombinante incluyendo un dominio extracelular:

QLHWRLGEMVTRLPGPAGSWEQLIQERRSHEVNPA AHLTGANSSLTGSGGP
LLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVT KAGYYIYSKVQLGGVGCPLGLASTIT
HGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEKV
VVRVLDERLVRRLRDGTRS YFGAFMV.

- 5 La composición de la proteína quimérica de la presente invención es para reducción de metástasis cancerosa por estimulación de linfocitos T citotóxicos y/o por estimulación de quimiocinas, moléculas de adhesión y moléculas coestimuladoras para inducir células T no inmunizadas. Las células T se activan dentro de un sitio tumoral y pueden circular en la sangre. Las células T circulantes son preferentemente específicas de cáncer. La generación de células T puede ser dependiente de CD8+.
- 10 Un ácido nucleico recombinante aislado incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una LIGHT mutante resistente a digestión por proteasas. Una realización de la secuencia de nucleótidos es:

ATGGAGGAGAGTGTCTGACGGCCCTCAGTGT TGTGGTGGATGGACAGAC
CGACATCCCATTCACGAGGCTGGGACGAAGCCACCGGAGACAGTCTGTGA
GTGTGGCCCCGGGTGGGTCTGGGTCTCTTGCTGTTGCTGATGGGGGCTGGGC
TGGCCGTCCAAGGCTGGTTCCTCCTGCAGCTGCACTGGCGTCTAGGAGAG
ATGGTCACCCGCCTGCCTGACGGACCTGCAGGCTCCTGGGAGCAGCTGAT
ACAAGAGCGAAGGTCTCACGAGGTCAACCCAGCAGCGCATCTCACAGGG
GCCAACTCCAGCTTGACCGGCAGCGGGGGGCCGCTGTTATGGGAGACTCA
GCTGGGCCTGGCCTTCCTGAGGGGCCTCAGCTACCACGATGGGGCCCTTG
TGGTCACCAAAGCTGGCTACTACTACATCTACTCCAAGGTGCAGCTGGGC
GGTGTGGGCTGCCCCGCTGGGCCTGGCCAGCACCATCACCCACGGCCTCTA
CAAGCGCACACCCCGCTACCCCGAGGAGCTGGAGCTGTTGGTCAGCCAGC
AGTCACCCTGCGGACGGGCCACCAGCAGCTCCCGGGTCTGGTGGGACAGC
AGCTTCCTGGGTGGTGTGGTACACCTGGAGGCTGGGGAGAAGGTGGTCGT
CCGTGTGCTGGATGAACGCCTGGTTCGACTGCGTGATGGTACCCGGTCTTA
CTTCGGGGCTTTCATGGTGTGA,

en la que la secuencia que codifica el sitio de digestión de proteasas GAGCAGCTGATA está mutada.

Breve descripción de los dibujos

- 15 La **FIG. 1** muestra ilustraciones esquemáticas de las construcciones heterodiméricas específicas de tumor AG 104A. La Ck humana se fusionó por medio de la región bisagra flexible superior de IgG3 humana al extremo C-terminal de un fragmento scFv que se derivó de un antígeno canceroso.
- La **FIG. 2** demuestra que Adv-mmlit inhibe crecimiento tumoral de neu+ N202. Se inyectaron aproximadamente 8×10^5 células N202 1A (i.c.). Se llevaron a cabo inyecciones intratumorales de aproximadamente 2×10^{10} vp adv-lacz o
20 adv-mmlit en el día 18 y en el día 20. El tamaño del tumor se sometió a seguimiento dos veces a la semana.
- La **FIG. 3** muestra diseño de estructura de proteína de fusión scFv-LIGHT.
- La **FIG. 4** muestra supresión de crecimiento tumoral después de tratamiento con anti-Her2 y Ad-LIGHT en el que se
25 inocularon 10^6 células tumorales Tubo a ratones BABL/c s.c. Se inyectaron 10^{10} VP de Ad-LIGHT o de Ad-LacZ intratumoralmente en el día 18 después de inoculación tumoral. Se inyectaron 50 mg de anticuerpo anti-Her 2 o de isotipo IgG i.p. en el día 18 y en el día 25 después de inoculación tumoral. El crecimiento tumoral se sometió a seguimiento en los puntos temporales indicados. Todos los grupos tratados tienen diferencia significativa comparados con el grupo de isotipo IgG después del día 21. El grupo de tratamiento de combinación de Ad-LIGHT y anti-Her2 tiene

diferencia sinérgica significativa comparada bien con grupo Ad-LIGHT solo o bien con grupo anti-Her2 solo después del día 25. Se llevó a cabo análisis estadístico con prueba de Student de dos colas. Los datos mostrados fueron medios + SEM. $p < 0,05$ se considera una diferencia significativa.

La **FIG. 5** muestra supresión de crecimiento tumoral después de tratamiento con anti-Her2. Se inocularon 10^6 células tumorales Tubo a ratones BABL/c s.c. Se inyectaron 100 mg de anticuerpo anti-Her 2 o de isotipo IgG i.p. en el día 10 y en el día 17 después de inoculación tumoral. El crecimiento tumoral se sometió a seguimiento en los puntos temporales indicados. El tumor volvió a crecer en tres de cada 5 ratones tratados con anti-Her 2.

La **FIG. 6** muestra producción de fusiones de anticuerpo-LIGHT. scFV-58LIGHT (LIGHT que contiene posiciones aminoácídicas 58-240) y scFV-85LIGHT (LIGHT que contiene posiciones aminoácídicas 85-240). La flecha apunta a las proteínas de fusión con tamaño apropiado.

Descripción detallada

La enfermedad metastásica es una causa principal de mortalidad entre los pacientes de cáncer. El letargo inicial de metástasis o de tumores primarios pequeños se puede atribuir a los niveles insuficientes de antígenos disponibles para inducir células T CD8+. Los procedimientos terapéuticos que utilizan un anticuerpo que reconoce un antígeno expresado por células tumorales acoplados con LIGHT (anticuerpo-LIGHT) marcan como objetivo específicamente y de forma efectiva células tumorales migrantes después de que tal Anticuerpo-LIGHT se introduzca sistémicamente por inyección intravenosa (i.v.).

Como un ejemplo, en un modelo de ratones, un anticuerpo monoclonal de alta afinidad contra células tumorales se acumula dentro de tumores *in vivo* con concentración alta después de inyección intravenosa. El heterominianticuerpo LIGHT (por conjugación o por ligazón genética) permite que LIGHT se administre específicamente en diversos sitios distales después de su introducción sistémica.

Una proteína de fusión de LIGHT (por ejemplo, par anticuerpo-LIGHT) se acumula selectivamente dentro de tejidos tumorales y se une específicamente a tumores *in vitro*.

Un anticuerpo que reconoce un antígeno expresado por células tumorales acopladas con LIGHT (anticuerpo-LIGHT) está diseñado para marcar como objetivo específicamente y de forma efectiva células tumorales migrantes después de que la Anticuerpo-LIGHT se introduzca sistémicamente por inyección intravenosa. Cualquier antígeno tumoral que se expresa sobre la superficie de la célula tumoral o que es capaz de reconocerse por un anticuerpo específico de tumores es adecuado para acoplarse con LIGHT o con un fragmento funcional de la misma.

La administración local de una LIGHT resistente a proteasas (por ejemplo, una LIGHT mutante o un dominio extracelular de LIGHT) potencia la presentación directa de antígenos tumorales a células T específicas de antígenos y evita la anergia de células T infiltradas dentro del microambiente tumoral. Además, LIGHT puede potenciar apoptosis tumoral *in vivo*.

La erradicación sucesiva de metástasis por tratamientos de cáncer actualmente disponibles sigue siendo rara. La generación de respuestas inmunes en tejidos tumorales primarios antes de resección quirúrgica produce células T efectoras específicas de tumores suficientes para erradicar las metástasis distantes. La inducción de células T CD8+ específicas de tumores, por ejemplo por administración de anticuerpo-LIGHT en el tumor primario promueve salida subsiguiente de linfocitos T citotóxicos (CTL) que se dirigen a tumores distales. Marcar como objetivo el tumor primario antes de la escisión quirúrgica facilita erradicación mediada por respuesta inmune de metástasis espontánea.

La metástasis es a menudo una etapa fatal en la progresión de malignidades sólidas. Las células tumorales metastásicas diseminadas pueden permanecer en letargo e indetectables clínicamente durante meses o incluso años tras la resección quirúrgica del tumor primario, conduciendo a la recurrencia de enfermedad clínica subsiguiente. Las estrategias inmunoterapéuticas son adecuadas para eliminar esta enfermedad micrometastásica. Como un ejemplo, la administración de anticuerpo-LIGHT dentro del tumor primario reduce la formación de metástasis y rechaza las metástasis establecidas en los tejidos periféricos. Por ejemplo, la administración directa de LIGHT en forma de una proteína de fusión de anticuerpo-LIGHT a tumores (por ejemplo, tumor primario) genera suficiente número de células T efectoras/de memoria a partir de los tejidos tumorales que se mueven a un sitio distal, conduciendo a un incremento general en la intensidad de la respuesta inmune, a producción de citocinas inflamatorias mayor y a la erradicación de metástasis espontáneas. La inmunoterapia usando tejidos tumorales primarios dirigida a provocar y mantener una respuesta inmune específica tumoral en presencia de antígenos tumorales endógenos genera los CTL necesarios para eliminar las células tumorales ya diseminadas.

En la presencia de LIGHT en la superficie de un tumor, se inducen eficientemente CTL y circulan subsiguientemente para infiltrar tumores distales negativos en LIGHT. Sin los beneficios de LIGHT que están presentes en el tumor primario, se esperan pocas células T activadas en un sitio tumoral secundario. Es probable que estas células T efectoras/de memoria generadas en el sitio tumoral local en la presencia de LIGHT sean capaces de salir del tumor y de patrullar la periferia y de identificar las células tumorales metastásicas. El receptor de quimiocina (CCR7) ha estado mostrando recientemente ser una molécula clave para las células T para salir de los tejidos periféricos, incluyendo el sitio inflamatorio y para que circulen hasta los nódulos linfáticos que se drenan. Las células T 2C que salen de los

tumores que expresan LIGHT pueden controlarse por CCR7.

Por ejemplo, un dominio extracelular de la molécula LIGHT puede expresarse recombinantemente de tal forma que bien la forma recombinante no tiene el sitio proteolítico todo junto o bien tiene uno o más cambios aminoacídicos que vuelven resistente a digestión por proteasas a la forma recombinante (LIGHT mutante). Además, el dominio extracelular o un derivado equivalente funcional del dominio extracelular de LIGHT pueden unirse a una secuencia enlazadora o de engarce o espaciadora para fijar el dominio extracelular en la membrana de las células tumorales. Las FIG. 2-3 ilustran algunos aspectos de una fusión o conjugación de anticuerpo-LIGHT.

El dominio extracelular de LIGHT se refiere a una forma del polipéptido LIGHT que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplásmicos. El dominio extracelular de LIGHT tiene menos del 1 % de tales dominios transmembrana y /o citoplásmicos y preferentemente, tendrán menos del 0,5 % de tales dominios. Se entiende que cualesquiera dominios transmembrana identificados para los polipéptidos LIGHT se identifican de conformidad con criterios empleados rutinariamente en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar pero probablemente en no más de aproximadamente 2-5 aminoácidos en cada extremo del dominio según se identificó inicialmente en el presente documento. Un dominio extracelular de polipéptido LIGHT puede contener desde aproximadamente 5 o menos aminoácidos en cada lado del límite de dominio transmembrana/dominio extracelular según se identifica en el presente documento.

Los fragmentos de proteína LIGHT y los péptidos de los mismos incluyen por ejemplo, posiciones aminoacídicas 1-240 de LIGHT sin uno o más de los aminoácidos que representan el sitio proteolítico EQLI (81-84); posiciones aminoacídicas 1-240 de LIGHT con uno o más de los aminoácidos que representan el sitio proteolítico EQLI (81-84) que está mutado o que está inactivado de otra forma; 82-240 de LIGHT; 83-240 de LIGHT; 84-240 de LIGHT; 85-240 de LIGHT; 90-240 de LIGHT; 95-240 de LIGHT; 100-240 de LIGHT; 85-235 de LIGHT; 85-230 de LIGHT; 85-225 de LIGHT; 85-220 de LIGHT; 85-215 de LIGHT; 85-200 de LIGHT; fragmento de LIGHT sin el dominio intracelular y de membrana; y cualquier fragmento que sea de aproximadamente 100-150 aminoácidos de longitud de LIGHT que sea resistente a digestión por proteasas.

"Anticuerpo-LIGHT" se refiere a un anticuerpo o a un fragmento del mismo específico contra un antígeno tumoral, que bien está fusionado o bien está conjugado a un fragmento de proteína LIGHT que es suficiente para activar una respuesta inmune frente a células tumorales y es capaz de estar presente de forma estable en una superficie de célula tumoral siendo resistente a digestión de proteasas comparada con una proteína LIGHT nativa.

Como se usa en el presente documento, el término "LIGHT" en un par anticuerpo-LIGHT se refiere bien a un dominio extracelular de LIGHT que no contiene una secuencia de reconocimiento de proteasas, o bien a una LIGHT mutante en la que el sitio de proteasas (EQLI) está inactivado por delección completa o por una mutación en uno o más aminoácidos que vuelven al sitio de proteasas insensible o inactivo o una forma truncada de LIGHT que es resistente a digestión de proteasas y capaz de estimular células T.

"LIGHT mutante" se refiere a una proteína LIGHT o a un péptido derivado de LIGHT que es resistente a escisión proteolítica, capaz de expresarse de forma estable en la superficie de las células tumorales y que muestra activación incrementada de células T específicas de tumores, comparada con proteína LIGHT normal o nativa. La "LIGHT mutante" se refiere a una proteína LIGHT o a péptidos o fragmentos derivados de proteína LIGHT que son resistentes a digestión por proteasas o que son capaces de expresarse de manera estable de otro modo en la superficie de las células incluyendo células tumorales debido a una mutación que vuelve inactivo el sitio proteolítico EQLI. Hay varias maneras de generar LIGHT mutante. Por ejemplo, el sitio de proteasas (*por ejemplo*, EQLI) puede mutarse bien para eliminar el sitio de proteasas en su totalidad o bien para volver al sitio resistente a digestión por proteasas cambiando (*por ejemplo*, inserción, delección, sustitución) uno o más aminoácidos en el sitio de proteasas.

La proteína "LIGHT truncada" se refiere a un fragmento de LIGHT que no es de longitud total cuando se compara con una LIGHT nativa, es resistente a digestión de proteasas y es capaz de estimular células T contra células tumorales. Por ejemplo, el dominio extracelular de LIGHT (aproximadamente 85-240) es una LIGHT truncada adecuada. LIGHT truncada incluye fragmentos/derivados de proteína LIGHT que son resistentes a digestión de proteasas mostrando de este modo la capacidad para estar presentes en la superficie celular durante un periodo de tiempo prolongado comparado con proteína LIGHT nativa.

Para generar proteína LIGHT resistente a proteasas (*por ejemplo*, LIGHT mutante) o fragmentos de proteína LIGHT o péptidos de LIGHT con el sitio de proteasas inactivado, *por ejemplo*, el aminoácido ácido glutámico (E), puede deleccionarse o sustituirse dentro de la secuencia de reconocimiento de proteasas EQLI. De forma similar, el aminoácido glutamina (Q) se deleciona o está sustituido por otro aminoácido dentro de la secuencia EQLI de reconocimiento de proteasas. De forma similar, el aminoácido L o I puede deleccionarse o sustituirse con otros aminoácidos. Los análogos de aminoácidos resistentes a proteasas pueden usarse también para generar fragmentos de LIGHT sintéticos que son resistentes a proteasas. Por ejemplo, usar la incorporación de β -aminoácidos dentro de péptidos hace decrecer la proteólisis y se puede usar para sustituir el sitio sensible a proteasas EQLI. La incorporación racional de β -aminoácidos dentro del sitio de proteasas y cerca del sitio de proteasas se puede llevar a cabo y los mutantes resultantes se pueden poner a prueba para resistencia a proteasas. Una diversidad de técnicas que incluyen mutagénesis dirigida a sitio se pueden usar generando fragmentos LIGHT que son resistentes a digestión por

proteasas.

El término "inactivado" significa que la proteína LIGHT o sus fragmentos de la misma es/son resistente(s) a digestión por proteasas en un ambiente tumoral debido a que el sitio de reconocimiento de proteasas se ha silenciado selectivamente bien por mutación en uno o más aminoácidos o bien por delección de EQLI o bien por sustitución de uno o más aminoácidos con α - o β -aminoácidos o por cualquier modo adecuado.

El término "resistente" quiere decir que la proteína LIGHT o sus fragmentos de la misma no son sensibles a digestión por proteasas en un ambiente tumoral debido a que el sitio de reconocimiento de proteasas se ha inactivado/mutado bien por mutación en uno o más aminoácidos o bien por delección de EQLI o por sustitución de uno o más aminoácidos con α - o β -aminoácidos o por cualquier modo adecuado.

El término "ambiente tumoral" hace referencia a la presencia y expresión y actividad de proteasas celulares incluyendo proteasas extracelulares que pueden tener influencia de forma cooperativa en degradación de matriz e invasión de células tumorales por cascadas proteolíticas, con proteasas individuales que tienen distintos papeles en crecimiento tumoral, invasión, migración, angiogénesis, metástasis y expansión de tumores.

"Ad-LIGHT" o "Ad-LIGHT mutante" se refiere a sistema de vector adenovírico recombinante que contiene LIGHT mutante que codifica ácidos nucleicos y es adecuado para administrar las secuencias de ácidos nucleicos a un sitio tumoral capaz de infectar células tumorales.

"Metástasis o metástases" se refiere al proceso por el que el cáncer se extiende a partir de la localización en la que se inicia el cáncer como un tumor hasta una o más localizaciones distantes en el cuerpo por migración de una o más células cancerosas. Estos términos también incluyen micro-metástasis en las que la formación de tumores en localizaciones distintas corresponden a agregados pequeños de células cancerosas que son visibles microscópicamente. Estos términos también se refieren al crecimiento canceroso secundario que resulta de la extensión del tumor primario a partir de la localización original.

"Reducir o controlar metástasis" se refiere a una reducción en el número de sitios tumorales metastásicos en comparación con un control.

"Transferencia adoptiva" se refiere a transferencia de células T en receptores.

"Sitio tumoral" significa una localización *in vivo* o *ex vivo* que contiene o es sospechosa de contener células tumorales. El sitio tumoral incluye tumores sólidos y también las localizaciones que son adyacentes o están inmediatamente cerca de un crecimiento tumoral.

"Específico de tumores" se refiere a un anticuerpo o a cualquier otro ligando/receptor que muestra preferencia por células tumorales por encima de las células normales. Por ejemplo, un anticuerpo marcado para un antígeno presente en células tumorales se considera específico de tumores. Un anticuerpo específico de tumores puede unirse también a una célula normal si el antígeno objetivo está presente, aunque a un menor grado.

Como se usa en el presente documento, el término "administración" se refiere a administración sistémica y/o local. El término "administración sistémica" se refiere a administración no localizada de tal forma que una sustancia administrada puede afectar varios órganos o tejidos por todo el cuerpo o de tal forma que una sustancia administrada puede atravesar varios órganos o tejidos por todo el cuerpo en el proceso de alcanzar un sitio objetivo. Por ejemplo, la administración dentro de la circulación de un sujeto puede dar como resultado la expresión de un producto terapéutico a partir de un vector administrado en más de un tejido u órgano, o puede resultar en expresión de un producto terapéutico a partir de un vector administrado en un sitio específico, por ejemplo, debido al tropismo natural o al engarce operable de elementos promotores específicos de tejidos. Alguien experto en la técnica entendería que diversas formas de administración están abarcadas por administración sistémica incluyendo las formas de administración abarcadas por administración parenteral tales como administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal y subcutánea. En algunas realizaciones, se puede usar la administración sistémica para facilitar un efecto sistémico asociado con tratamiento de una enfermedad o afección local o sistémica. Un efecto sistémico puede ser deseable para una enfermedad o afección local, por ejemplo, para evitar extensión de dicha enfermedad o afección. El término "administración local" se refiere a administración en o cerca de un sitio específico. Alguien de habilidad en la técnica entendería que diversas formas de administración están abarcadas por administración local, tal como inyección directa dentro o cerca de un sitio específico. En algunas reivindicaciones, la administración local está asociada con tratamiento de una enfermedad o afección donde se desea un efecto local (*por ejemplo* administración al pulmón por el tratamiento de cáncer de pulmón). Un efecto local puede desearse en asociación bien con enfermedades o afecciones locales o bien con enfermedades o afecciones sistémicas. Un efecto local puede desearse en asociación con una enfermedad o afección sistémica para tratar un aspecto local de una enfermedad o afección sistémica.

Una "cantidad efectiva" de producto de fusión Anticuerpo-LIGHT o de un conjugado de Anticuerpo-LIGHT se refiere a una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito establecido específicamente. Una "cantidad efectiva" se puede determinar empíricamente y en una manera rutinaria, en relación con el propósito establecido. Un propósito adecuado para el par Anticuerpo-LIGHT es reducir el tamaño o crecimiento del tumor y/o reducir metástasis.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un conjugado de anticuerpos o producto de fusión de polipéptido LIGHT efectivo para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva de los compuestos divulgados en el presente documento puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar y/o detener) infiltración de células cancerosas dentro de órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar y/o detener) metástasis tumoral; inhibir crecimiento tumoral; y/o aliviar uno o más de los síntomas asociados con el cáncer.

El término "anticuerpo" abarca, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos de cadena individual, fragmentos de anticuerpos (véase más abajo) en la medida en que presentan la actividad biológica o inmunológica deseada. El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa intercambiamente con anticuerpo en el presente documento. Los anticuerpos pueden marcar de forma específica un antígeno tumoral, por ejemplo, antígeno tumoral de superficie tal como por ejemplo Her2/neu y CD20.

Un "anticuerpo aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. El anticuerpo se purifica a más del 95 % en peso de anticuerpo según se determina por el procedimiento de Lowry y a más del 99 % en peso.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir los anticuerpos individuales de la población son idénticos salvo por posibles mutaciones que se dan en la naturaleza que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico o un epítipo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar por la metodología de hibridoma descrita primero por Kohler y cols., *Nature*, 256: 495 (1975), o se pueden fabricar usando procedimientos de ADN recombinante en células bacterianas, células animales eucariotas o células vegetales eucariotas (véase, por ejemplo, Patente de los EE.UU. N.º: 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" pueden aislarse también a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson y cols., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks y cols., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, mientras muestren la actividad biológica deseada (véase Patente de los EE.UU. N.º: 4.816.567; y Morrison y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81: 6851-6855 (1984). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígenos de dominio variable derivadas de un primate no humano y secuencias de región constante humanas.

"Fragmentos de anticuerpos" incluyen una parte de un anticuerpo intacto, por ejemplo la unión a antígeno o la región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, fragmentos F_v y F_v de cadena individual; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase Patente de los EE.UU. N.º: 5.641.870; Zapata y cols., *Protein Eng.* 8 (10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos de cadena individual; y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpos.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas (anticuerpos receptores) humanas en los que los residuos de una región hipervariable del receptor están reemplazados por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpos donantes) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpos deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) F_v de la inmunoglobulina humana están reemplazados por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden incluir residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado incluye sustancialmente todos los al menos uno y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también incluirá opcionalmente al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana.

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos se conocen bien en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoácidos introducidos dentro de él desde una fuente que no es humana. Estos restos aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos "importados", que habitualmente se toman de un dominio variable "importado". Se puede llevar a cabo humanización siguiendo el el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones y cols., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y cols., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen y cols., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)], sustituyendo DCR de roedores o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con ello, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los EE.UU. N.º: 4.816.567), en los que se ha sustituido sustancialmente menos de

un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Están contempladas diversas formas de fusiones o conjugados de anticuerpo-LIGHT humanizados. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que está conjugado con LIGHT o un fragmento extracelular de la misma. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG 1 intacto.

Como alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir una diversidad de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. Véanse, por ejemplo, Jakobovits y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 2551 (1993); Jakobovits y cols., Nature, 362: 255-258 (1993).

Alternativamente, puede usarse la tecnología de presentación en fagos (véase, por ejemplo, J. McCafferty y col., Nature 348: 552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos humanos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominios variables (V) de inmunoglobulinas de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, se clonan los genes de dominios V de anticuerpos en fase dentro de un gen de proteínas bien de la cubierta principal o bien de la cubierta secundaria de un bacteriófago filamentosos, tal como M13 o fd y se presentan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula del fago (véase por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993)). Los anticuerpos humanos pueden generarse también por células B activadas *in vitro* (véanse Patentes de los EE.UU. N.ºs: 5.567.610 y 5.229.275).

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos. Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse también directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Todos los fragmentos de anticuerpos contra Fab, Fv y ScFv pueden expresarse en y segregarse a partir de *E. coli*, permitiendo de este modo la producción sencilla de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de las colecciones de fagos de anticuerpos. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de los EE.UU. N.º: 5.641.870 por ejemplo. Tales fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Se pueden fabricar conjugados del anticuerpo y moléculas coestimuladoras tales como LIGHT usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis(p-diazoniumbenzoi)-etilendiamino), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Un dominio extracelular de LIGHT o fragmentos del mismo están conjugados a un anticuerpo o a fragmentos de anticuerpos que son específicos para un antígeno tumoral, preferentemente, un antígeno tumoral de superficie.

Alternativamente, se puede hacer una proteína de fusión que comprende el anticuerpo de antígeno antitumoral y LIGHT, por ejemplo, por técnicas recombinantes o por síntesis de péptidos. La longitud de ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado bien adyacentes la una a la otra o bien separadas por una región que codifica un péptido de engarce que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

Los complejos anticuerpo-LIGHT divulgados en el presente documento se pueden formular también como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para administración de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma están dispuestos comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describe en la Patente de los EE.UU. N.ºs: 4.485.045 y 4.544.545; y en el documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se describen en la Patente de los Estados Unidos N.º: 5.013.556.

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosificación y el modo de administración se escogerán por el médico de acuerdo con criterios conocidos. La dosificación apropiada de producto de conjugado Anticuerpo-LIGHT o de producto de fusión Anticuerpo-LIGHT puede depender del tipo de cáncer a tratarse, de la gravedad y el curso de la enfermedad, del tamaño del tumor, de la extensión de las metástasis, de si el anticuerpo se administra para propósitos preventivos o para propósitos terapéuticos, de la terapia anterior, del historial clínico del paciente y de la respuesta al anticuerpo y de la discreción del médico que atiende. La composición anticuerpo-LIGHT se administra adecuadamente al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Preferentemente, la composición se administra por infusión intravenosa o por inyecciones subcutáneas. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg (p. ej., aproximadamente 0,1-15 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para administración al paciente, por ejemplo, mediante una o más

administraciones aparte o mediante infusión continua. Un régimen de dosificación puede incluir administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 5 mg/kg, seguido por una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo anti-TAT. No obstante, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. Una dosificación diaria típica puede variar desde aproximadamente 1 mg/kg hasta 100 mg/kg o más, en función de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas en varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad, por ejemplo, reducción en tamaño/volumen del tumor y reducción en metástasis. El progreso de esta terapia se puede someter a seguimiento por procedimientos y ensayos convencionales y se puede basar en criterios conocidos por el médico u otras personas de habilidad en la técnica.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a, o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o malignidades linfoides. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epitelial), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma péptico, melanoma, mieloma múltiple y linfoma de células B, cerebro, así como cáncer de cabeza y cuello y metástasis asociadas.

Los antígenos tumorales de superficie adecuados que pueden marcarse usando una fusión de anticuerpo-LIGHT o un conjugado de anticuerpo-LIGHT incluyen familia de receptores de factores de crecimiento epidérmico (EGFR) incluyendo HER1, HER2, HER4 y HER8 (Nam, N.H., & Parang, K. (2003), Current targets for anti-cancer drug discovery. Current Drug Targets, 4 (2), 159-179), STEAP (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata; Hubert y cols., STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 1999; 96 (25): 14523-8), CD55 (Hsu y cols., Generation and characterization of monoclonal antibodies directed against the surface antigens of cervical cancer cells., Hybrid Hybridomics. 2004; 23 (2): 121-5). Otros anticuerpos adecuados incluyen Rituximab (Rituxan™, un anticuerpo anti-CD20 quimérico), Campath-1H (anticuerpo anti-CD52) y cualesquiera antígenos de superficie celular específicos de cáncer. Lo siguiente es una lista ejemplar de fármacos de anticuerpos monoclonales aprobados contra tipos de cáncer específicos que son adecuados para usar con proteína LIGHT: Alemtuzumab (Campath™) para leucemia linfocítica crónica; Bevacizumab (Avastin™) para cáncer de colon y cáncer de pulmón; Cetuximab (Erbix™) para cáncer de colon y cáncer de cabeza y cuello; Gemtuzumab (Mylotarg™) para leucemia mielógena aguda; Ibritumomab (Zevalin™) para linfoma no de Hodgkin; Panitumumab (Vectibix™) para cáncer de colon; Rituximab (Rituxan™) para linfoma no de Hodgkin; Tositumomab (Bexxar™) para linfoma no de Hodgkin; y Trastuzumab (Herceptin™) para cáncer de mama.

Ejemplos

Los ejemplos no pertenecientes a la invención son para propósitos ilustrativos solamente.

Ejemplo 1: LIGHT de acoplamiento o de conjugación a un agente que marca como objetivo un tumor.

En un aspecto de la invención para permitir administración de un sistema de administración de LIGHT mutante o un sistema de administración equivalente, LIGHT mutante puede acoplarse o conjugarse a un agente de marcar como objetivo tumores tal como un anticuerpo específico de tumores. Por ejemplo, un anticuerpo específico de tumores conjugado con LIGHT o con LIGHT mutante se puede usar administrando de manera selectiva la proteína de fusión al sitio tumoral. Además, se puede diseñar un anticuerpo específico de tumor acoplándose con un sistema de administración vírico o con un sistema de administración de vehículo liposómico. El vehículo de administración que expresa la LIGHT mutante y que alberga el agente que marca como objetivo tumores primero marcará como objetivo la célula tumoral específica y después transformará la célula tumoral expresando LIGHT mutante sobre la superficie de la célula. Esta expresión de LIGHT mutante marcada como objetivo en la superficie de las células tumorales inducirá quimioquinas en células estromales que rodearán el tumor atrayendo células T e iniciando la inducción de células T. Tales tratamiento son adecuados para todos los tumores, incluyendo tumores sólidos. Se trataron 4T1, MC38, B16 y mastocitoma con Ad-LIGHT y mostraron una reducción de tumores primarios y/o de tumores secundarios. Por lo tanto, se puede usar anticuerpo-LIGHT marcando como objetivo diversos tumores, especialmente metástasis que se forma como un resultado de las células del tumor primario que migran a lugares distantes. Por ejemplo, por inyección sistémica, el anticuerpo anti-her2/neu con LIGHT puede llevar LIGHT hasta tumor metastásico que exprese her2/neu y después puede generar una respuesta inmune local eliminando tumor. Por lo tanto, la proteína de fusión puede administrarse por cualquier vía sistémica y local y la proteína de fusión se localizará más hacia tumores debido a la especificidad de anticuerpo u otro agente para antígenos tumorales.

Ejemplo 2: Actividades funcionales de un anticuerpo conjugado con LIGHT.

La capacidad de anticuerpo-LIGHT uniéndose a los receptores de LIGHT, LTβR y HVEM, está determinada por citometría de flujo con LTβR-Ig y HVEM-Ig, respectivamente. La actividad funcional de anticuerpo-LIGHT se pone a

prueba primero *in vitro* por su capacidad coestimulando células T en presencia de dosis subóptimas de anti-CD3 unido a placa. La funcionalidad de anticuerpo-LIGHT parece comparable con la de anti-CD28.

Poniendo a prueba si la proteína de fusión Anticuerpo-LIGHT inhibe crecimiento tumoral *in vivo*, los ratones se inyectan s.c. con 5×10^4 células tumorales durante diez días y después se tratan con 10 µg de la proteína de fusión. La inhibición del crecimiento tumoral se demuestra por una pequeña dosis de proteína de fusión, es decir 10 µg. La proteína de fusión permite fuerte inmunidad contra tumor.

Este ejemplo demuestra la capacidad de anticuerpo-LIGHT uniendo los receptores de LIGHT, LTβR y HVEM por citometría de flujo con LTβR-Ig y HVEM-Ig, respectivamente y demuestra que un anticuerpo específico tumoral acoplado con LIGHT estimula inmunidad reduciendo crecimiento tumoral.

10 **Ejemplo 3: Tratamiento de combinación de par de anticuerpo-LIGHT y administración local de adenovirus que expresan LIGHT.**

Una utilidad importante de una proteína de fusión de anticuerpo-LIGHT o de un conjugado de anticuerpo-LIGHT es que tales reactivos de marcado como objetivo pueden ser muy potentes eliminando pequeños números de células tumorales metastásicas o células de cáncer residuales que no estimulan de forma efectiva el sistema inmune. En un aspecto, se ponen a prueba una terapia de combinación que incluye anticuerpo-LIGHT y adenovirus que expresa LIGHT, o que expresa Ad-LIGHT.

Las células tumorales se inocularon en dos sitios, uno con 10^6 y el otro lado con 1×10^4 . Dos semanas después, el tumor más grande (10^6) se trata con Ad-LIGHT y se elimina quirúrgicamente dos semanas después del tratamiento. Los ratones se trataron sistemáticamente con Anticuerpo-LIGHT a dosis descritas en el presente documento. Este modelo determina si Anticuerpo-LIGHT en combinación con administración local de Ad-LIGHT a tumor primario es un reactivo potente tratando tumores distales. Las células T 2C, que se identifican fácilmente por el anticuerpo clonotípico (1B2), se pueden transferir adoptivamente a los ratones que llevan tumores como un modelo de células T CD8+ específicas de antígeno tumoral. La circulación, proliferación y activación de células T 2C transferidas adoptivamente se someten a seguimiento y se comparan con diferentes estrategias terapéuticas.

Dos sistemas de administración clínicamente relevantes, Ad-LIGHT y Anticuerpo-LIGHT se espera que dirijan de forma efectiva LIGHT al tejido tumoral y que subsiguientemente destruyan no solamente los tumores primarios sino también las metástasis distales. La expresión sostenida de LIGHT suficiente para crear una estructura similar a la linfóide mediada por LIGHT induce las respuestas de células T CD8⁺ antitumorales.

Ejemplo 4: Terapia de anticuerpo anti-Her2/neu-LIGHT para cáncer de mama.

Una quinta parte de los pacientes de cáncer de mama y de cáncer de colon expresan Her2/neu. Generalmente, el anticuerpo para Her2 ralentiza el crecimiento de estos tumores pero no los erradica. El anticuerpo anti-Her2/neu acoplado con LIGHT dirige LIGHT al sitio de tumor metastásico. El anticuerpo anti-Her2/neu ralentiza el crecimiento del tumor e induce apoptosis, lo que permite a la LIGHT acoplada inducir que tengan lugar el reclutamiento y activación mediadas por LIGHT de células T dentro del tumor. Adicionalmente, LIGHT recluta también células FcR+ mejorando el efecto terapéutico de anticuerpo anti-neu. En un modelo experimental, dosis tan bajas como 10 mg de un anticuerpo tumoral unido con LIGHT ralentizaron el crecimiento de tumor en ratones. Se contemplan otras dosis más bajas o más altas. El anticuerpo anti-Her2/neu-LIGHT es un tratamiento novedoso para metástasis de cáncer de mama. La FIG. 2 demuestra que Adv-mmlit inhibe el crecimiento tumoral de neu+ N202.

40 **Ejemplo 5: Uso de fármacos de quimioterapia en combinación con fusión de anticuerpo-LIGHT o con conjugados de anticuerpo-LIGHT.**

Una proteína de fusión anticuerpo-LIGHT específica de tumores o un conjugado anticuerpo-LIGHT específico de tumores está acoplado adicionalmente con un agente antitumoral tal como por ejemplo doxorubicina, paclitaxel, docetaxel, cisplatina, metotrexato, ciclofosfamida, 5-fluorouridina, Leucovorina, Irinotecán (CAMPTOSAR TM o CPT-11 o Camptotecina-11 o Campto), Carboplatina, fluorouracilo carboplatina, edatrexato, gemcitabina, o vinorelbina o una combinación de los mismos. Estos fármacos bien pueden administrarse por separado o bien pueden coadministrarse por conjugación o acoplamiento con la proteína de fusión Anticuerpo-LIGHT o el conjugado Anticuerpo-LIGHT.

Esta terapia de combinación puede coadministrarse también con terapia génica por lo que un ácido nucleico capaz de expresar una LIGHT resistente a proteasas se administra dentro de un tumor. Los vectores adenovíricos que albergan secuencias aminoácidas de LIGHT, o Ad-LIGHT, son adecuados.

Ejemplo 6: Supresión sinérgica de tumores por anticuerpo anti-Her2 y tratamiento con Ad-LIGHT.

La sinergia de anticuerpo anti-neu con LIGHT. Tubo es la línea tumoral de ratones Balb/c Tg que sobreexpresan el gen neu mutante. Esta línea tumoral es sensible a tratamiento de anticuerpos *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, cuando un tumor está bien establecido, el efecto bien de anticuerpo o bien de LIGHT solos está disminuido. Después de que se hace discontinuo el anticuerpo anti-neu, tubo vuelve a crecer en 3-4 semanas. Determinando si hay una sinergia entre

las dos, las células de tubo se establecieron durante 18 días y después se trataron tanto con anticuerpo ad-LIGHT como con anticuerpo anti-neu una vez a la semana durante tres semanas. De forma impresionante, no se pudo detectar ningún tumor en esta combinación mientras que el tumor crece progresivamente con tratamiento individual de ambos (FIGS. 4-5). Todos los cinco ratones en cada grupo tienen tumores salvo el de tratamiento combinatorio.

- 5 Combinar así terapia mediada por LIGHT, por ejemplo, por vector que expresa Ad-LIGHT o por otra presentación de LIGHT estable a células tumorales con cualquier otra terapia anticáncer proporciona productos terapéuticos de supresión tumoral sinérgicos.

Ejemplo 7: Generación de proteínas de fusión anticuerpo-LIGHT.

- 10 Se construyeron expresándose sc-Fv-LIGHT, scFV-58LIGHT (fragmento de LIGHT con posiciones aminoácidas 58-240) y scFV-85LIGHT (fragmento de LIGHT con posiciones aminoácidas 85-240, evitando el sitio de proteasas de 81-84). Se unió marca de contacto al fragmento de LIGHT tras realizar una prueba de bandas de western ya que el anticuerpo antimarca es muy específico y sensible. Tales plásmidos se transfectaron dentro de una línea celular 293. Las células se recogieron una semana más tarde y los lisados se prepararon y transfirieron con anticuerpo anti-marca. La flecha apunta a la proteína de fusión con tamaño apropiado (FIG. 6). La expresión de scFv-85LIGHT es más alta
15 que la de scFv-58LIGHT.

- 20 Esto demuestra que la construcción de fusión de anticuerpo-LIGHT genera proteínas de fusión y que las proteínas de fusión resultantes se pueden aislar, purificar y usar demostrando que las proteínas de fusión de anticuerpo-LIGHT marcan como objetivo específicamente células tumorales y estimulan producción de células T contra las células tumorales. Se pueden hacer proteínas de fusión similares de LIGHT con cualquier otro anticuerpo que se dirija contra un antígeno de superficie de células tumorales y preferentemente que marque como objetivo un antígeno de superficie celular específica de tumores.

Materiales y procedimientos

- 25 *La generación de proteína de fusión de anticuerpo-LIGHT.* Se desarrolló una construcción de anticuerpo recombinante designada heterominianticuerpo que permite el marcado como objetivo específico de LIGHT a un anticuerpo que se une a un antígeno tumoral o a células tumorales con alta afinidad usando protocolo estándar.

- 30 *Ratones, líneas celulares y reactivos.* Se adquirieron ratones hembra C3HXC57BL/6 F1 (C3B6F1), de 4-8 semanas de edad del National Cancer Institute, Frederick Cancer Research Facility, (Frederick, MD). Se adquirieron ratones deficientes C57BL/6-RAG-1 (RAG-1^{-/-}) a partir del Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Se adquirieron ratones transgénicos H-Y TCR (ratones H-Y) que son transgénicos en el precedente RAG-2-deficiente/B6 de Taconic Farms (Germantown, NY). Ratones transgénicos 2C TCR que son transgénicos en precedente RAG-1-deficiente reproducidos en B6 durante 10 generaciones (ratones 2C) se proporcionaron por J. Chen (Massachusetts Institute of Technology, Boston, MA). Ratones transgénicos OT-1 TCR (ratones OT-1) se proporcionaron por A. Ma (la
35 Universidad de Chicago). Los ratones RAG-1^{-/-}, H-Y, 2C, OT-1 se reprodujeron y mantuvieron en la instalación libre de patógenos específica en la Universidad de Chicago. El cuidado animal y el uso de animales estaban de acuerdo con directrices internacionales.

- 40 El H-2L^d murino que expresa AG104A (AG104-L^d), el transfectante de células AG104A, se ha descrito anteriormente (Wick M, 1997, JEM). Estas líneas celulares tumorales se mantuvieron en DMEM (Mediatech) suplementadas con FCS al 10 % (Sigma-Aldrich), penicilina a 100 U/ml y estreptomycin a 100 µg/ml (BioWhittaker). Las líneas celulares de hibridoma que producen anti-L^d (clon 30-5-7) y anti-2C TCR (1B2) se obtuvieron a partir de D. Sachs (National Institutes of Health, Bethesda, MD) y T. Gajweski (la Universidad de Chicago), respectivamente.

- 45 Los anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas se purificaron a partir del sobrenadante de cultivo con columna de proteínas G por procedimientos conocidos por aquellos de habilidad en la técnica. El anticuerpo de 1B2 antedecente se conjugó a FITC o biotina por la Instalación de Anticuerpos Monoclonales de la Universidad de Chicago. Se adquirieron anticuerpo anti-CD8 acoplado a PE, estreptavidina acoplada a Cy-chrome (CyC), anticuerpo anti-CD44 acoplado a CyC, anticuerpo anti-CD62L acoplado a PE y anticuerpo Th1.2 acoplado a PE de BD Biosciences. Se adquirió IgG antirratón de cabra conjugada con FITC de Caltag. Se adquirió estreptavidina acoplada a PE de Immunotech. Se adquirió IgG antihumano de burro acoplada a PE de Jackson Immunological Research Lab (West grove, PA). Se adquirió anticuerpo anti-SLC de cabra biotinilado de R&D systems Inc. (Mineápolis, MN). Se adquirió anticuerpo IgG anticabra de conejo de Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA). Se adquirió anticuerpo anti-SCL de cabra purificado de PeproTech (Rock hill, NJ). Se adquirió colagenasa (tipo 4) de Sigma-Aldrich. Se adquirió CFSE de
50 Molecular Probes. Se han descrito anteriormente proteínas de fusión HVEM-Ig y LTUR-Ig usadas en este estudio.

- 55 *Crecimiento tumoral in vivo.* Las células tumorales se inyectaron subcutáneamente en la parte baja de la espalda, es decir, 0,5-1 cm por encima de la base del rabo del ratón. El crecimiento tumoral se midió cada 3 a 4 días con un calibrador. El tamaño en centímetro cúbicos se calculó por la fórmula $V = nabc/6$, donde a, b y c son tres diámetros ortogonales.

Histología. Los tejidos tumorales para examen de histología se recogieron en el tiempo indicado y se fijaron en formalina tamponada neutral al 10 %, se procesaron a montaje de parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Para tinción inmunohistoquímica de SLC, se recogieron los tejidos tumorales, se montaron en el compuesto OCT (Miles-Yeda, Rehovot, Israel) y se congelaron a -70 °C. Las secciones congeladas (5-10 mm de grosor) se fijaron en formalina fría al 2 % en PBS y se permeabilizaron con saponina al 0,1 %/PBS. Las secciones se prebloquearon con suero de cabra al 5 % en saponina al 0,1 %/PBS durante media hora a temperatura ambiente en una cámara humidificada. Se hizo tinción para SLC incubando primero con anticuerpo anti-SLC biotinilado de cabra (R&D systems Inc. Mineápolis, MN) a una dilución 1/25 en tampón de bloqueo. Se añadió 2 horas después anticuerpo Ig anti-cabra de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA). Para tinción de inmunofluorescencia, se bloquearon secciones con suero de ratón normal al 2 %, suero de conejo y suero de cabra en PBS durante media hora a temperatura ambiente en una cámara humidificada. Se reemplazó la solución de bloqueo con 50 µl de anticuerpos primarios, anti-Th1.2 conjugado con PE (BD PharMingen), o anti-CD8 conjugado con PE (BD PharMingen), se diluyó 1/100 en solución de bloqueo y las secciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Los especímenes se montaron en Mowiol 4-88 (BD Biosciences, La Jolla, CA) conteniendo 1,4-diazobencilo[2.2.2]octano al 10 %. Se analizaron las muestras antes de que pasasen 48 horas usando un microscopio Zeiss Axioplan (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y una cámara Photometrics PXL CCD (Photometrics, Tucson, AZ). Se llevó a cabo deconvolución no contigua usando Openlab v2.0.6 (Improvision, Lexington, MA).

ELISA por CCL21. Se prepararon homogenados tumorales y se ensayaron por CCL21. La cantidad comparable de tejidos tumorales a partir de ratones portadores de tumores se recogió y pesó, se homogeneizó en PBS que contenía inhibidores de proteasas y los sobrenadantes se recogieron por centrifugación. Se revistieron placas de microvaloración de 96 pocillos (Immulon 4, Dynatech Laboratories, Chantilly, VA) con CCL21 antirratón de cabra a 2 µg/ml en PBS y se bloquearon después con seroalbúmina bovina al 0,1 % (BSA) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar, se añadieron diluciones en serie de concentraciones conocidas (CCL21 recombinante, 50 ng/ml, R&D) y las muestras se añadieron e incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de 3 lavados, se añadió anticuerpo anti-SCL de conejo a los pocillos. Después de incubación de 2 horas y lavado, se añadieron 50 µl de una avidina conjugada con fosfatasa alcalina (Dako) diluida 1/1000 durante 1 hora y después se dejó desarrollar. El desarrollo de color se midió a 405 nm en un lector de placa automatizado (Spectra-Max 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y la cantidad de CCL21 se determinó por ELISA a partir de la curva estándar y se normalizó de acuerdo con el peso tisular. Los datos son la media ± d.e.

Ensayo de co-estimulación de células T. Las células T se purificaron por un procedimiento de selección negativa en el campo magnético como se instruyó por la elaboración (Miltenyi Biotec, Auburn, California). La pureza de células aisladas fue mayor del 95 %, como se evaluó por citometría de flujo usando anticuerpo monoclonal frente a CD3. Las placas revestidas con 0,2 g/ml de anticuerpo monoclonal contra CD3 se revistieron adicionalmente a 37 °C durante 4 horas con LIGTH mutante-marca. Después de lavarse, se cultivaron células T purificadas (1×10^6 células/ml) en los pocillos. Se usó anticuerpo monoclonal contra CD28 (1 mg/ml) en forma soluble. En todos los ensayos, la proliferación de células T se evaluó por la adición de ^3H -timidina a 1 Ci/pocillo durante las últimas 15 horas del cultivo de 3 días. La incorporación de ^3H -timidina se midió en un contador de centelleo de microplaca TopCount (Packard instrument, Meriden, CT).

Aislamiento celular a partir de tejido tumoral. Los ratones se sangraron primero disminuyendo la contaminación de la sangre con el tejido tumoral. Los tejidos tumorales se recogieron, se lavaron en el PBS, se cortaron en pedazos y se resuspendieron en DMEM suplementado con FCS al 2 % y con 1,25 mg/ml de collagenasa D (solución de collagenasa D) durante 40 minutos en un incubador de agitación a 37 °C. La suspensión de células individuales se recogió después de 40 minutos y las aglutinaciones celulares se digirieron durante otros 40 minutos en la solución de collagenasa D hasta que todo el tejido tumoral se redisolvió dentro de una suspensión de células individuales.

Composiciones farmacéuticas: Las composiciones terapéuticas usadas en el presente documento se pueden formular en composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo adecuado para el procedimiento de administración deseado. Los vehículos adecuados incluyen materiales que cuando se combinan con la composición terapéutica mantienen la función antitumoral de la composición terapéutica. Los ejemplos incluyen un número de vehículos farmacéuticos estándar tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato estériles, agua bacteriostática y similares. Las formulaciones terapéuticas pueden solubilizarse y administrarse por medio de cualquier vía apropiada para administrar la composición terapéutica al sitio tumoral. Las vías potencialmente efectivas de administración incluyen intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intraorgánica, ortotrópica y similares. Una formulación para inyección intravenosa incluye la composición terapéutica en una solución de agua bacteriostática preservada, agua no preservada estéril, y/o diluida en bolsas de cloruro de polivinilo o de polietileno que contienen cloruro de sodio estéril para inyección. Las preparaciones de proteínas terapéuticas se pueden liofilizar y almacenar como polvos estériles, preferentemente al vacío y se pueden reconstituir después en agua bacteriostática (conteniendo por ejemplo, conservante de alcohol bencílico) o en agua estéril antes de inyección. Las dosificaciones y los protocolos de administración para el tratamiento de cánceres usando los procedimientos divulgados en el presente documento pueden variar con el procedimiento y el cáncer marcado como objetivo y dependen generalmente de un número de factores apreciados y entendidos en la técnica.

Medida de citocinas en el bazo y en tumor. Se prepararon homogenados de tumor y de bazo como está descrito (Yu y cols., 2003). Brevemente, cantidades comparables de tejidos tumorales o tejidos de bazo se recogieron, pesaron y homogeneizaron en PBS conteniendo inhibidores de proteasas y los sobrenadantes se recogieron por centrifugación. La cantidad de citocinas en los sobrenadantes se cuantificó usando el kit de matriz de perlas citométrico (CBA) (BD

Biosciences) en un citómetro de Calibrador FACS equipado con software CellQuestPro y CBA (Becton Dickinson) de acuerdo con la instrucción de elaboración.

Análisis estadístico por diferencia en crecimiento tumoral. Debido a que se observó el crecimiento tumoral repetidas veces a lo largo del tiempo en el mismo ratón, los modelos de efecto aleatorio para datos longitudinales se usaron analizando tales datos. Para cada experimento, se asume que el crecimiento tumoral depende del tratamiento y que sigue una velocidad de crecimiento lineal a lo largo del tiempo. El modelo dio una estimación general del desplazamiento y de la pendiente del crecimiento lineal para cada grupo. Se dejó variar tanto el desplazamiento como la pendiente entre ratones individuales. La pendiente, es decir, la velocidad de crecimiento se comparó entre diferentes grupos de tratamiento. Debido a que el crecimiento tumoral actual puede no seguir una tendencia de crecimiento lineal durante el periodo de seguimiento. El incremento del crecimiento tumoral se ralentizó en la fase temprana y llegó a ser rápido en la fase tardía en algunos experimentos. Se añadió un término cuadrático al tiempo de seguimiento en los modelos de efecto aleatorio anteriores.

Secuencia de ADN de LIGHT humana de tipo silvestre (la secuencia que codifica un sitio de proteasas EQLI se muestra en negrita):

ATGGAGGAGAGTGTCTGACGGCCCTCAGTGTTTGTGGTGGATGGAC
AGACCGACATCCCATTCACGAGGCTGGGACGAAGCCACCGGAGACAGTC
GTGCAGTGTGGCCCGGGTGGGTCTGGGTCTCTTGCTGTTGCTGATGGGGGC
TGGGCTGGCCGTCCAAGGCTGGTTCCTCCTGCAGCTGCACTGGCGTCTAGG
AGAGATGGTCACCCGCCTGCCTGACGGACCTGCAGGCTCCTGGGAGCAG
CTGATACAAGAGCGAAGGTCTCACGAGGTCAACCCAGCAGCGCATCTCA
CAGGGGCCAACTCCAGCTTGACCGGCAGCGGGGGGCCGCTGTTATGGGAG
ACTCAGCTGGGCCTGGCCTTCCTGAGGGGCCCTCAGCTACCACGATGGGGC
CCTTGTGGTCACCAAAGCTGGCTACTACTACATCTACTCCAAGGTGCAGCT
GGGCGGTGTGGGCTGCCCCGCTGGGCCTGGCCAGCACCATCACCCACGGCC
TCTACAAGCGCACACCCCGCTACCCCGAGGAGCTGGAGCTGTTGGTCAGC
CAGCAGTCACCCTGCGGACGGGCCACCAGCAGCTCCCGGGTCTGGTGGGA
CAGCAGCTTCCTGGGTGGTGTGGTACACCTGGAGGCTGGGGAGAAGGTGG
TCGTCCGTGTGCTGGATGAACGCCTGGTTCGACTGCGTGATGGTACCCGGT
CTTACTTCGGGGCTTTCATGGTGTGA-3' (SEC ID N.º: 3).

Secuencia de aminoácidos de LIGHT humana nativa (el sitio de digestión por proteasas está en negrita y subrayado):

MEESVVRPSVFVVDGQTDIPFTRLGRSHRRQSCSVARVGLGLLLLLLMG
AGLAVQGWFLQLHWRLGEMVTRLPDGPAGSW**EQLIQERRSHEVNPA AHL**
TGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGY YIYSKVQLG
GVGCPGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFL
GGVVHLEAGEKVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV (SEC ID N.º: 1)

Un aspecto de la secuencia de aminoácidos de LIGHT humana mutante (EQLI está ausente, indicado por puntos):

MEESVVRPSVFVVDGQTDIPFTRLGRSHRRQSCSVARVGLGLLLLLLMGAGLA
VQGWFLQLHWRLGEMVTRLPDGPAGSW....QERRSHEVNPA AHLTGANSSL
TGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGY YIYSKVQLGGVCPGL
GLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHL
EAGEKVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV (SEC ID N.º: 4).

Secuencia de nucleótidos de codones optimizados (SEC ID N.º: 5) para LIGHT mutante de ratones, el ATG de inicio está resaltado en negrita:

```

GGGCGAATTGGGTACCGGATCCGCCACCAATGGAGAGCGTGGTGCAGCCAGCGTGTTTCGT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTGGACGGCCAGACCGACATCCCCTTCAGGAGGCTGGAGCAGAACCACAGGCGGAGGAG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGTGGCACCCTGCAGGTGTCCCTGGCCCTGGTGTCTGCTGCTGGGCGCTGGCCTGGCCAC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCAGGGCTGGTTTCTGCTGAGGCTGCACCAGAGGCTGGGCGACATCGTGGCCACCTGCC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGATGGCGGCAAGGGCAGCTGGCAGGACCAGAGGAGCCACCAGGCCAACCTGCCGCCCA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCTGACAGGCGCCAACGCCAGCCTGATCGGCATCGGCGGACCCCTGCTGTGGGAGACCAG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCTGGGCCTGGCTTTCCTGAGGGGCTGACCTACCACGACGGCGCCCTGGTGACCATGGA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCCCCGGCTACTACTACGTGTACAGCAAGGTGCAGCTGTCCGGAGTGGGCTGCCCTCAGGG
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCTGGCCAACGGCCTGCCCATCACCCACGGCCTGTACAAGAGGACCAGCAGATACCCCAA
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGAGCTGGAGCTGCTGGTCTCCAGGCGGAGCCCCTGTGGCAGGGCCAACAGCAGCCGAGT
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTGGTGGGACAGCAGCTTCTTGGCGGCGTGGTGCACCTGGAGGCCGGCGAGGAGTGGT
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTGAGGGTGCCCGGCAACAGGCTGGTGAGGGCCAGGGACGGCACCAGGAGCTACTTCGG
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGCCTTCATGGTGTGATGAGCGGCCGCGAGCTCCAGCTTTTGTTCCT
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGGGAAGTACCACACTACTCGCCGGCGCTCGAGGTCGAAAACAAGGG

```

5 Secuencia de nucleótidos de codones optimizados para LIGHT mutante humano (SEC ID N.º: 6), el ATG de inicio está resaltado en negrita.

```

GAATTCGAGCTCGGTACCCGACACGGTACCGGATCCGCCACCAATGGAGGAGAGCGTTGTG
AGGCCCAGCGTGTTCTGTGGTGGACGGCCAGACCGACATCCCCTTCACCCGGCTGGGCCGG
AGCCACCGGAGGCAGAGCTGCTCCGTGGCCAGAGTGGGGCTGGGCCTGCTGCTCCTGCTG
ATGGGAGCCGGCCTGGCCGTGCAGGGCTGGTTCTGCTGCAGCTGCACTGGCGGCTGGGC
GAGATGGTGACCCGGCTGCCCAGTGGCCCTGCCGGCAGCTGGCAGGAGCGGCGGAGCCAC
GAGGTGAACCTTGCCGCCACCTGACCGGCGCCAACAGCAGCCTGACCGGCAGCGGCGGA
CCCCTGCTGTGGGAGACCAGCTGGGCCTGGCCTTCTGAGGGGCTGAGCTACCACGAC
GGCGCCCTGGTGGTGACCAAGGCCGGCTACTACTACATCTACAGCAAGGTGCAGCTGGGC
GGAGTGGGCTGCCCTCTGGGGCTGGCCAGCACCATCACCCACGGCCTGTACAAGCGGACC
CCCAGATACCCCGAGGAGCTGGAGCTGCTGGTGTCCCAGCAGAGCCCCTGTGGCAGGGCC
ACCTCCAGCAGCCGGGTGTGGTGGGACAGCAGCTTCTGGGCGGCGTGGTGACCTGGAG
GCCGGCGAGAAAGTGGTTGTGAGGGTGTGGACGAGCGGCTTGTGAGGCTGAGGGACGGC
ACCCGAGCTACTTCGGCGCCTTCATGGTGTGATGAGCGGCCGCGAGCTCGTCTCGGGGA
TCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTG

```

La generación de vectores y clones de expresión de LIGHT mutantes pcDNA3.1-LIGHT se usó como plantilla generando dos fragmentos de ADN de doble hebra A y B por PCR. Para generación de fragmento A (~ 500 p.b.), se

usaron cebador en el sentido correcto 5'-CATGGATCCAAGACCATGGAGAGTGTGGTACA-3' (el texto en negrita indicó el sitio *Bam*HI) y cebador antisentido 5'-AGATCGTTGATCTTGCCAGGAGCCTTTGCC-3'. Generando fragmento B (~ 200 p.b.), se usaron cebador en el sentido correcto 5'-GGCAAAGGCTCCTGGCAAGATCAACGATCT-3' y cebador antisentido 5'-ACCTCTAGATCAGACCATGAAAGCTCCGA-3' (el texto subrayado indicó sitio *Xba*I). El cebador antisentido para fragmento A es complementario con el cebador en sentido correcto para fragmento B, lo que cubre secuencias para aminoácidos (a.a.) 73-87 entre los que a.a. 79-82 se delecionaron. Los fragmentos A y B se mezclaron, se desnaturalizaron a 94 °C y se enfriaron hasta temperatura ambiente fusionando los dos fragmentos de ADN. El producto de ADN fusionado se usa como plantilla para una reacción de PCR y el producto se clonó en pcDNA3.1 usando *Bam*HI y *Xba*I. La delección de a.a. 79-82 se verificó secuenciando. Generando LIGHT pMFG-mutante, se digirió LIGHT pcDNA3.1-mutante con *Nco*I y *Bam*HI y se ligó a un plásmido pMFG-S-TPA digerido con *Nco*I y al plásmido pMFG-S-TPA digerido con *Bam*HI (Mulligan RC, Massachusetts Institute of Technology, Boston, MA).

Publicaciones citadas

Ali y cols., Gene Therapy 1: 367-384 (1994).

Anderson, Science 256: 808-813 (1992).

Armentano y cols., J. Virol. 71: 2408-2416 (1997).

Berkner y cols., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158: 39-61 (1992).

Blank y cols., PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. Cancer Res 64: 1140-1145 (2004). Boon, T. & van der Bruggen, P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes.

Exp. Med. 183, 725-29 (1996).

Boyce y cols., PNAS 93: 2348-2352 (1996).

Brandyopadhyay y cols., Mol. Cell. Biol. 4: 749-754 (1984).

Cannon, R.E. y cols. Induction of transgene expression in Tg.AC(v-Ha-ras) transgenic mice concomitant with DNA hypomethylation. Mol Carcinog 21, 244-50 (1998).

Carter, "The Growth Cycle of Adeno-Associated Virus," en Handbook of Parvoviruses, vol. I, páginas 155-168, Tijssen, ed., CRC Press (1990).

Chen, L., Linsley, P.S. & Hellstrom, K.E. Costimulation of T cells for tumor immunity. Immunol Today 14, 483-6. (1993). Chen y cols., Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 94: 1645-1650 (1997).

Cyster, J.G. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. Science, 286, 2098-102. (1999).

Dougall, W.C. y cols. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. Genes Dev 13, 2412-24. (1999). Engelhardt y col., Hum. Gene Ther. 5: 1217-1229 (1994).

Ettinger, R. The role of tumor necrosis factor and lymphotoxin in lymphoid organ development. Curr Top Microbiol Immunol 251, 203-10 (2000).

Fu, Y.X. & Chaplin, D.D. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. Annu Rev Immunol 17, 399-433 (1999).

Glorioso y cols., Nature Med. 7: 33-40 (2001).

Golasten y cols., New Engl. J. Med. 309: 288-296 (1983).

Hofmann y cols., PNAS 92: 10099-10103 (1995).

Hu y Pathak, Pharmacol Rev. 52: 493-512 (2000).

Ishibashi y cols., J. Clin. Invest. 92: 883-893 (1993).

Ishibashi y cols., J. Clin. Invest. 93: 1889-1893 (1994).

Jooss y cols., Hum Gene Ther. 7: 1555-1566 (1996).

Kang, H.S. y cols. Signaling via LTbetaR on the lamina propria stromal cells of the gut is required for IgA production. Nat Immunol 3, 576-82 (2002).

- Kay y cols., *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 94: 4686-4691.
- Kim, D. y cols. Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *J Exp Med* 192, 1467-78. (2000).
- 5 Kong, Y.Y. y cols. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402, 304-9. (1999).
- Kuriyama y cols., *Hum. Gene Ther.* 11: 2219-2230 (2000).
- Leder, A., Kuo, A., Cardiff, R.D., Sinn, E. & Leder, P. v-Ha-ras transgene abrogates the initiation step in mouse skin tumorigenesis: effects of phorbol esters and retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 87, 9178-82 (1990).
- 10 Mauri, D.N. y cols. LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity* 8, 21-30. (1998).
- Madzak y cols., *J. Gen. Virol.* 73: 1533-36 (1992).
- Melero, I. y cols. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* 3, 682-5. (1997).
- Miller, Curr. *Top. Microbiol. Immunol.* 158: 1-24 (1992).
- 15 Miller y cols., *Nature* 357: 455-450 (1992);
- Moss y cols., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 158: 25-38 (1992).
- Margulskes, Curr. *Top. Microbiol. Immunol.* 158: 67-93 (1992).
- Muzyczka, Curr. *Top. Microbiol. Immunol.* 158: 97-123 (1992).
- 20 Ochsenbein, A.F. y cols. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 411, 1058-64. (2001).
- Ostrand-Rosenberg, S. y cols. Cell-based vaccines for the stimulation of immunity to metastatic cancers. *Immunol Rev* 170, 101-14. (1999).
- Peace, D.J. y cols. Lysis of ras oncogene-transformed cells by specific cytotoxic T lymphocytes elicited by primary in vitro immunization with mutated ras peptide. *J Exp Med* 179, 473-9 (1994).
- 25 Rooney, I.A. y cols. The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells. *J Biol Chem* 275: 14307-15. (2000).
- Rosenberg, S.A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411, 380-4. (2001).
- Ruddle, N.H. Lymphoid neo-organogenesis: lymphotoxin's role in inflammation and development. *Immunol Res* 19, 119-25 (1999).
- 30 Sarma, S. y cols. Cytotoxic T lymphocytes to an unmutated tumor rejection antigen P1A: normal development but restrained effector function in vivo. *J Exp Med* 189, 811-20. (1999).
- Schreiber, H. Tumor Immunology. in *Fundamental Immunology* (ed. Paul, W.E.) 1247-1280 (Lippincott Raven Press, Nueva York, 1999).
- Schieder y cols., *Nature Genetics* 18: 180-183 (1998).
- 35 Sha, W.C. y cols. Selective expression of an antigen receptor on CD8-bearing T lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 335, 271-4 (1988).
- Somia y Verma, *Nature Rev.* 1: 91-99 (2000).
- Tamada, K. y cols. Modulation of T-cell-mediated immunity in tumor and graft-versus-host disease models through the LIGHT co-stimulatory pathway. *Nat Med* 6, 283-9. (2000).
- 40 Tanzawa y cols., *FEBS Letters* 118 (1): 81-84 (1980).
- van Beusechem y cols., *Gene Ther.* 7: 1940-1946 (2000).
- Wang, J. y cols. The complementation of lymphotoxin deficiency with LIGHT, a newly discovered TNF family member, for the restoration of secondary lymphoid structure and function. *Eur J Immunol* 32: 1969 (2002).

Wang, J. y cols. The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell derived LIGHT. J. Clinic. Invest. 108: 1771-1780 (2001).

Watanabe, Atherosclerosis 36: 261-268 (1986).

5 Wick, M. y cols. Antigenic cancer cells grow progressively in immune hosts without evidence for T cell exhaustion or systemic anergy. J Exp Med 186, 229-38. (1997).

Wilson, Nature 365: 691-692 (1993).

Wu, Q. y cols. The requirement of membrane lymphotoxin for the presence of dendritic cells in lymphoid tissues. J Exp Med 190, 629-38 (1999).

10 Ye, Q. y cols. Modulation of LIGHT-HVEM costimulation prolongs cardiac allograft survival. J Exp Med 195, 795-800. (2002).

Ye, Z. y cols. Gene therapy for cancer using single-chain Fv fragments specific for 4-1BB. Nat Med 8, 343-8. (2002).

Yu, P. y cols., Complementary role of CD4+ T cells and secondary lymphoid tissues for cross-presentation of tumor antigen to CD8+ T cells. J Exp Med 197: 985-995 (2003).

15 P. y cols., Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. J Exp Med 201: 779-791 (2005).

Zhai, Y. y cols. LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer. Journal of Clinical Investigation 102, 1142-51 (1998).

Zinkernagel, R.M. Immunity against solid tumors? Int J Cancer 93, 1-5. (2001).

Pat. de los EE.UU. N.º: 6.048.551.

20 Pat. de los EE.UU. N.º: 5.436.146.

Pat. de los EE.UU. N.º: 4.980.286

Patente de los EE.UU. N.º: 5.994.523

Patente de los EE.UU. N.º: 6.207.147

Patente de los EE. UU. N.º: 4.797.368

25 Patente de los EE.UU. N.º: 5.399.346.

Listado de secuencias

<110> LA UNIVERSIDAD DE CHICAGO

<120> PRODUCTOS DE FUSIÓN ANTICUERPO-LIGHT PARA PRODUCTOS TERAPÉUTICOS DE CÁNCER

30

<130> 100-045

<140> Documento EP 08754530.7 (basado en el documento PCT/US2008/006381)

<141> 14-5-2008

35

<150> Documento 60/917.852

<151> 14-5-2007

<160> 12

40

<170> PatenIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 240

5 <212> PROTEÍNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Glu Glu Ser Val Val Arg Pro Ser Val Phe Val Val Asp Gly Gln
 1              5              10              15

Thr Asp Ile Pro Phe Thr Arg Leu Gly Arg Ser His Arg Arg Gln Ser
      20              25              30

Cys Ser Val Ala Arg Val Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu Met Gly
      35              40              45

Ala Gly Leu Ala Val Gln Gly Trp Phe Leu Leu Gln Leu His Trp Arg
 50              55              60

Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp Gly Pro Ala Gly Ser Trp
65              70              75              80

Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser His Glu Val Asn Pro Ala Ala
      85              90              95

His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Leu
      100              105              110

Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr
      115              120              125

His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys Ala Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr
      130              135              140

Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys Pro Leu Gly Leu Ala Ser
      145              150              155              160

Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Pro Arg Tyr Pro Glu Glu
      165              170              175

Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser Pro Cys Gly Arg Ala Thr Ser
      180              185              190

Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe Leu Gly Gly Val Val His
      195              200              205

Leu Glu Ala Gly Glu Lys Val Val Val Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu
      210              215              220

Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val
      225              230              235              240

```

<210> 2

<211> 181

<212> PROTEÍNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

Gln Leu His Trp Arg Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp Gly
 1           5           10           15
Pro Ala Gly Ser Trp Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser His Glu
          20           25           30
Val Asn Pro Ala Ala His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr Gly
          35           40           45
Ser Gly Gly Pro Leu Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe Leu
 50           55           60
Arg Gly Leu Ser Tyr His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys Ala Gly
 65           70           75           80
Tyr Tyr Tyr Ile Tyr Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys Pro
          85           90           95
Leu Gly Leu Ala Ser Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Pro
          100          105          110
Arg Tyr Pro Glu Glu Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser Pro Cys
          115          120          125
Gly Arg Ala Thr Ser Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe Leu
          130          135          140
Gly Gly Val Val His Leu Glu Ala Gly Glu Lys Val Val Val Arg Val
          145          150          155          160
Leu Asp Glu Arg Leu Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe
          165          170          175
Gly Ala Phe Met Val
          180

```

10

<210> 3

<211> 723

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<400> 3

ES 2 433 967 T3

```

atggaggaga gtgtcgtacg gccctcagtg tttgtggtgg atggacagac cgacatccca 60
ttcacgaggc tgggacgaag ccaccggaga cagtcgtgca gtgtggcccg ggtgggtctg 120
ggtctcttgc tgttgctgat gggggctggg ctggccgtcc aaggctggtt cctcctgcag 180
ctgcactggc gtctaggaga gatggtcacc cgcctgcctg acggacctgc aggctcctgg 240
gagcagctga tacaagagcg aaggctctcac gaggtcaacc cagcagcgca tctcacaggg 300
gccaaactcca gcttgaccgg cagcgggggg ccgctgttat gggagactca gctgggcctg 360
gccttcctga ggggcctcag ctaccacgat ggggccttg tggtcaccaa agctggctac 420

tactacatct actccaaggt gcagctgggc ggtgtgggct gcccgtggg cctggccagc 480
accatcaccc acggcctcta caagcgcaca ccccgctacc ccgaggagct ggagctgttg 540
gtcagccagc agtcaccctg cggacggggc accagcagct cccgggtctg gtgggacagc 600
agcttcctgg gtggtgtggt acacctggag gctggggaga aggtggtcgt ccgtgtgctg 660
gatgaacgcc tggttcgact gcgtgatggt acccggtctt acttcggggc tttcatggtg 720
tga 723

```

<210> 4

5 <211> 236

<212> PROTEÍNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

10

ES 2 433 967 T3

Met	Glu	Glu	Ser	Val	Val	Arg	Pro	Ser	Val	Phe	Val	Val	Asp	Gly	Gln	1	5	10	15
Thr	Asp	Ile	Pro	Phe	Thr	Arg	Leu	Gly	Arg	Ser	His	Arg	Arg	Gln	Ser	20	25	30	
Cys	Ser	Val	Ala	Arg	Val	Gly	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Met	Gly	35	40	45	
Ala	Gly	Leu	Ala	Val	Gln	Gly	Trp	Phe	Leu	Leu	Gln	Leu	His	Trp	Arg	50	55	60	
Leu	Gly	Glu	Met	Val	Thr	Arg	Leu	Pro	Asp	Gly	Pro	Ala	Gly	Ser	Trp	65	70	75	80
Gln	Glu	Arg	Arg	Ser	His	Glu	Val	Asn	Pro	Ala	Ala	His	Leu	Thr	Gly	85	90	95	
Ala	Asn	Ser	Ser	Leu	Thr	Gly	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Leu	Trp	Glu	Thr	100	105	110	
Gln	Leu	Gly	Leu	Ala	Phe	Leu	Arg	Gly	Leu	Ser	Tyr	His	Asp	Gly	Ala	115	120	125	
Leu	Val	Val	Thr	Lys	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Lys	Val	Gln	130	135	140	
Leu	Gly	Gly	Val	Gly	Cys	Pro	Leu	Gly	Leu	Ala	Ser	Thr	Ile	Thr	His	145	150	155	160
Gly	Leu	Tyr	Lys	Arg	Thr	Pro	Arg	Tyr	Pro	Glu	Glu	Leu	Glu	Leu	Leu	165	170	175	
Val	Ser	Gln	Gln	Ser	Pro	Cys	Gly	Arg	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Arg	Val	180	185	190	
Trp	Trp	Asp	Ser	Ser	Phe	Leu	Gly	Gly	Val	Val	His	Leu	Glu	Ala	Gly	195	200	205	
Glu	Lys	Val	Val	Val	Arg	Val	Leu	Asp	Glu	Arg	Leu	Val	Arg	Leu	Arg	210	215	220	
Asp	Gly	Thr	Arg	Ser	Tyr	Phe	Gly	Ala	Phe	Met	Val	225	230	235					

<210> 5

<211> 814

5 <212> ADN

<213> Mus spp.

<400> 5

```

gggcgaattg ggtaccggat ccgccaccat ggagagcgtg gtgcagccca gcgtgttcgt 60
ggtggacggc cagaccgaca tccccttcag gaggtctggag cagaaccaca ggcggaggag 120
atgtggcacc gtgcaggtgt ccctggccct ggtgctgctg ctgggcgctg gcctggccac 180
ccagggctgg tttctgctga ggctgcacca gaggtctggc gacatcgtgg ccacctgcc 240
cgatggcggc aagggcagct ggcaggacca gaggagccac caggccaacc ctgccgcca 300
cctgacaggc gccaacgcca gcctgatcgg catcggcgga cccctgctgt gggagaccag 360
gctgggcctg gctttcctga ggggcctgac ctaccacgac ggcgccctgg tgaccatgga 420
gcccggctac tactacgtgt acagcaaggt gcagctgtcc ggagtgggct gccctcaggg 480
cctggccaac ggctgcccc taccacacgg cctgtacaag aggaccagca gatacccca 540
ggagctggag ctgctggtct ccaggcggag cccctgtggc agggccaaca gcagccgagt 600
gtggtgggac agcagcttcc tgggcggcgt ggtgcacctg gaggccggcg aggaggtggt 660
ggtgaggggtg cccggcaaca ggctggtgag gccagggac ggcaccagga gctacttcgg 720
cgccttcctg gtgtgatgag cggccgcgag ctccagctt tgttcccgcg gaagtaccac 780
actactcgcc ggcgctcgag gtcgaaaaca aggg                                     814

```

<210> 6

<211> 814

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

gaattcgagc tcggtaccgg acacgggtacc ggatccgcca ccatggagga gagcgttgtg 60
aggcccagcg tgttcgtggg ggacgggccag accgacatcc ccttcaccgg gctggggccg 120
agccaccgga ggcagagctg ctccgtggcc agagtggggc tgggcctgct gctcctgctg 180
atgggagccg gcctggccgt gcagggctgg ttcttctgct agctgactg gcggtctggc 240
gagatggtga cccggctgcc cgatggccct gccggcagct ggcaggagcg gcggagccac 300
gaggtgaacc ctgccgcca cctgaccggc gccaacagca gcctgaccgg cagcggcgga 360
cccctgctgt gggagaccca gctgggcctg gccttcctga ggggcctgag ctaccacgac 420
ggcgccctgg tggtagccaa ggccggctac tactacatct acagcaaggt gcagctgggc 480
ggagtgggct gccctctggg gctggccagc accatcacc acggcctgta caagcggacc 540
cccagatacc ccgaggagct ggagctgctg gtgtcccagc agagccctg tggcagggcc 600
acctccagca gccgggtgtg gtgggacagc agcttcctgg gcggcgtggt gcacctggag 660
gccggcgaga aagtggttgt gaggggtgctg gacgagcggc ttgtgaggct gagggacggc 720
acccggagct acttcggcgc ctcatggtg tgatgagcgg ccgcgagctc gtctcgggga 780
tcctctagag tcgacctgca ggcattgcaag cttg                                     814

```

10

<210> 7

<211> 32

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

20 <400> 7

catggatcca agaccatgga gagtgggta ca 32

<210> 8

<211> 30

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

10

<400> 8

agatcgttga tctgccagg agcctttgcc 30

<210> 9

15 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

<400> 9

ggcaaaggct cctggcaaga tcaacgatct 30

25 <210> 10

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

<400> 10

acctctagat cagaccatga aagctccga 29

35

<210> 11

<211> 5

<212> PROTEÍNA

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 11

		Arg Thr Val Ala Ala
10	1	5

<210> 12

<211> 15

<212> PROTEÍNA

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

20 <400> 12

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un anticuerpo específico de tumor unido a un fragmento de una proteína LIGHT humana, en la que el fragmento LIGHT es resistente a digestión por proteasas, en la que adicionalmente el fragmento de LIGHT es de al menos 100 aminoácidos de longitud y es suficiente para estimular linfocitos T citotóxicos contra células tumorales.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo y el fragmento de la proteína LIGHT comprenden una proteína de fusión
o en la que el fragmento de la proteína LIGHT está conjugado químicamente al anticuerpo.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal humanizado, un fragmento de anticuerpo que incluye la región de unión a antígenos del anticuerpo intacto, un anticuerpo quimérico, un heteromínuculo y un anticuerpo de cadena simple.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que el fragmento de la proteína de LIGHT comprende una sección de un dominio extracelular de la proteína LIGHT.
5. La composición de la reivindicación 1, en la que el fragmento comprende una secuencia de aminoácidos a partir de las posiciones alrededor de 85-240 de la proteína LIGHT humana.
6. La composición de la reivindicación 1, en la que el fragmento de LIGHT comprende una mutación en la secuencia EQLI de reconocimiento de proteasas inactivando de este modo la secuencia de reconocimiento de proteasas o en la que el sitio de proteasas está deletado.
7. La composición de la reivindicación 5, en la que la proteína LIGHT humana tiene SEC ID N.º 1.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en reducir el crecimiento de tumor primario o de metástasis cancerosas.
9. La composición para su uso de la reivindicación 8, en la que el anticuerpo reconoce un antígeno tumoral de superficie.
10. La composición para su uso de la reivindicación 8, en la que el anticuerpo es específico para un antígeno tumoral seleccionado del grupo que consiste en HER2, HER4, HER8, EGFR y STEAP.
11. La composición para su uso de la reivindicación 8 que comprende adicionalmente un agente quimioterapéutico o radioterapia.
12. Una proteína quimérica que comprende una región peptídica que reconoce un antígeno tumoral y un fragmento de una proteína LIGHT, en la que el fragmento de LIGHT es resistente a digestión por proteasas, en la que adicionalmente el fragmento de LIGHT es de al menos 100 aminoácidos de longitud y es suficiente para estimular linfocitos T citotóxicos contra células tumorales.

Anti-antígenos tumorales

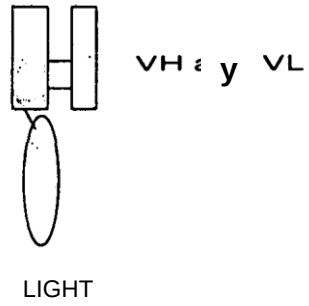


FIG. 1

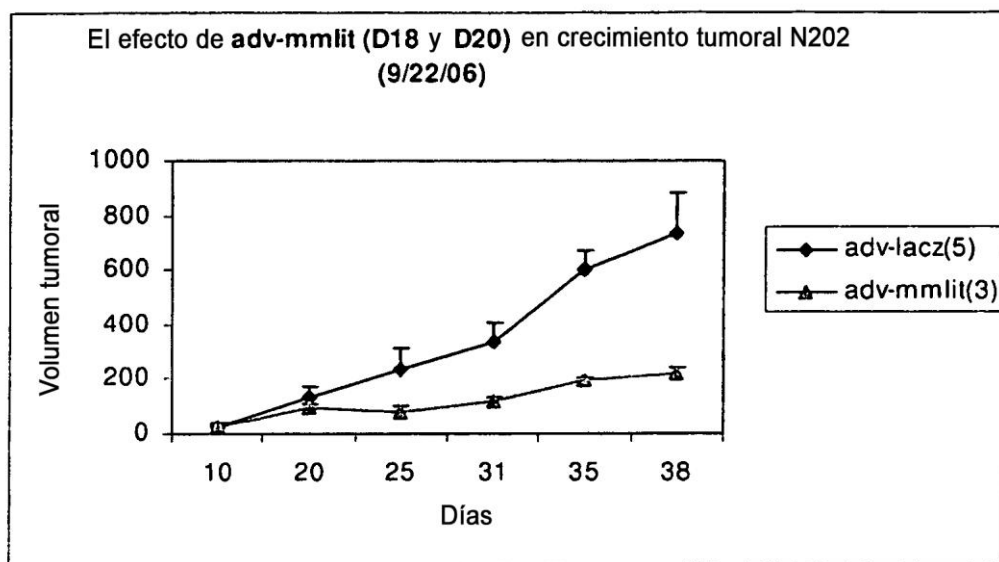


FIG. 2

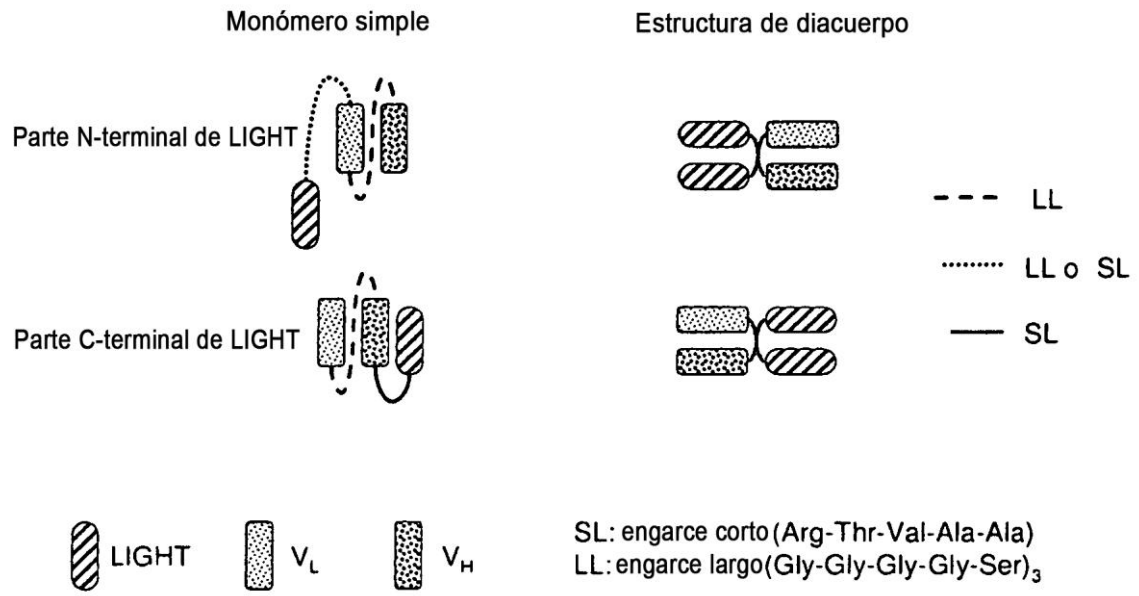


FIG. 3

Crecimiento tumoral después de tratamiento con Ad-LIGHT y/o con anti-Her 2

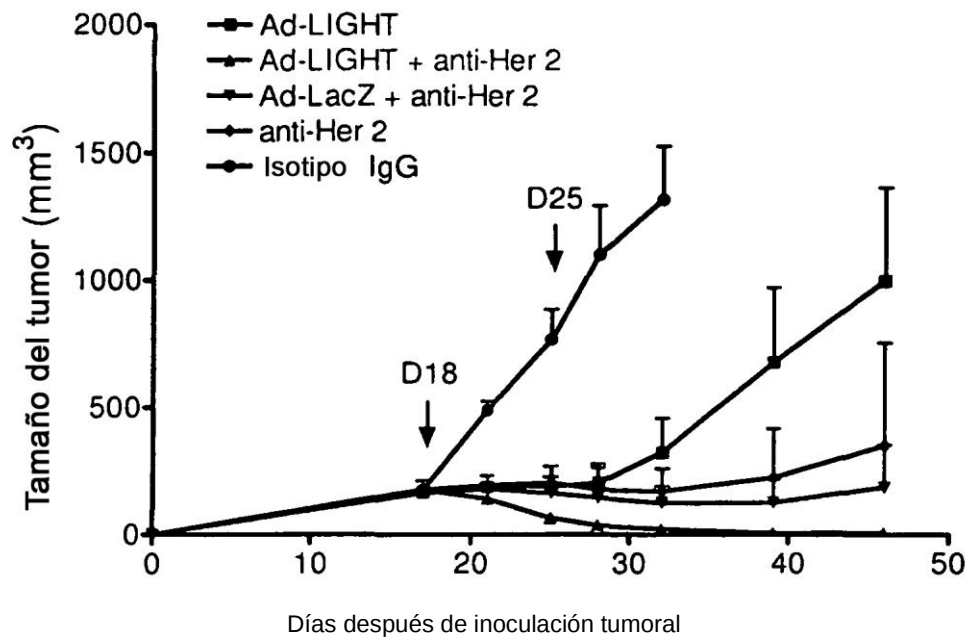


FIG. 4

Crecimiento tumoral después de tratamiento con anti-Her 2

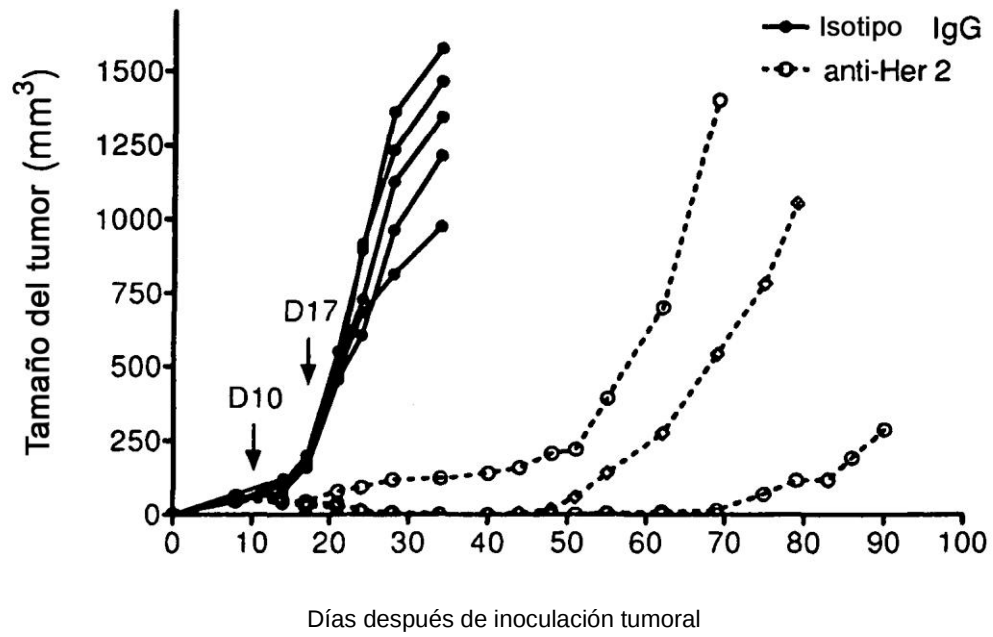


FIG. 5

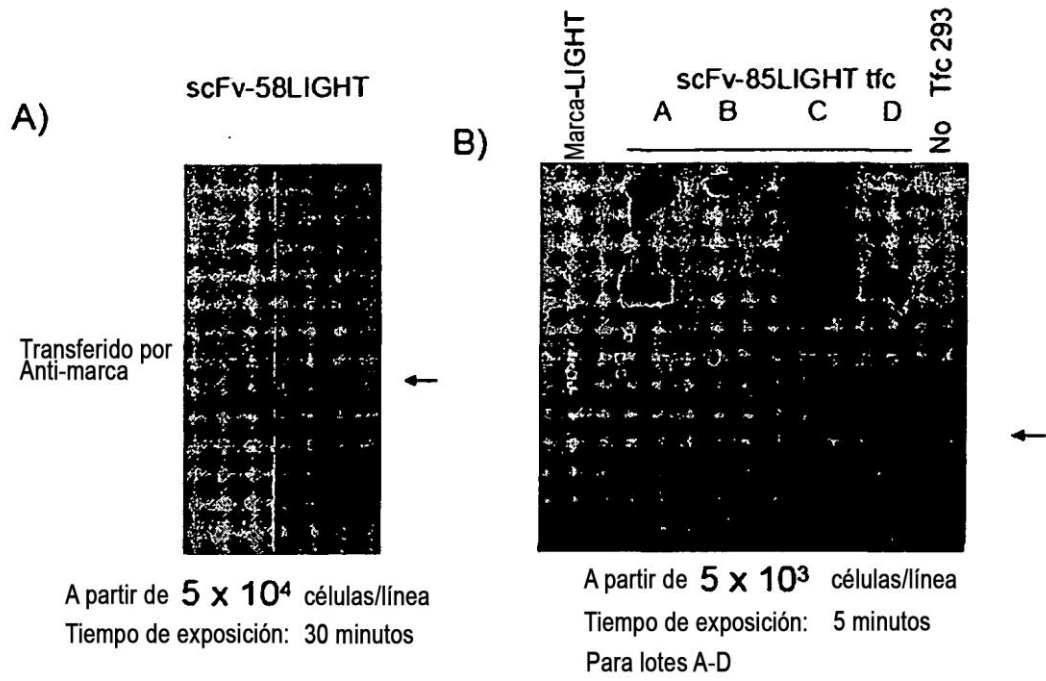


FIG. 6